



LARISSA BARBOSA DE SOUSA

**MTA REPAIR HP E BIO C REPAIR: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA, MIGRATÓRIA E EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS**

MTA REPAIR HP AND BIO C REPAIR: ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL,
CYTOTOXIC, MIGRATION AND CYTOKINE EXPRESSION

Brasília, Distrito Federal

2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LARISSA BARBOSA DE SOUSA

**MTA REPAIR HP E BIO C REPAIR: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA, MIGRATÓRIA E EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende

Brasília, Distrito Federal

2025

LARISSA BARBOSA DE SOUSA

**MTA REPAIR HP E BIO C REPAIR: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA, MIGRATÓRIA E EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em: **27/02/2025**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende (Presidente)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jacy Ribeiro de Carvalho Junior

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Poliana Amanda Oliveira Silva

Instituto Odontológico das Américas

Profa. Dra. Stella Maris de Freitas Lima (Suplente)

Universidade Católica de Brasília

*Dedico este trabalho a minha mãe e ao meu pai, in memoriam,
que sempre fizeram de tudo para que o estudo fosse a minha maior riqueza
e por nunca terem medido esforços pela minha educação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por sempre me abençoar, me proteger e cuidar de mim. Agradeço por me conceder muito mais do que eu peço. Deus sempre foi meu alicerce em todos os desafios que eu enfrentei ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. A cada passo dado eu senti as Tuas mãos guiando meus caminhos mesmo quando as dificuldades surgiram e me deu a força necessária para enfrentar as adversidades e vencê-las com êxito. Sem Deus eu nada seria e não teria chegado até aqui.

A **Nossa Senhora** pela intercessão e por sempre ouvir as minhas preces. Agradeço por me guiar por bons caminhos, pela sabedoria e discernimento. Sempre me acolhendo e me guardando sob teu Santo Manto de amor e misericórdia.

À minha amada e querida mãe, **Maria Antônia**, por todo apoio incondicional em cada passo dessa jornada. Suas orações, torcidas e bênçãos me fortalecem todos os dias. Ter você ao meu lado é um privilégio, obrigada por nunca medir esforços para que eu possa estudar, você é a minha maior fortaleza e eu peço a Deus que lhe conceda muita saúde. Se Deus quiser eu vou conseguir retribuir tudo o que a senhora já fez e faz por mim. Obrigada por todos os ensinamentos e por todos os conselhos. Deus foi muito generoso de ter me dado uma mãe tão incrível como a senhora que é meu maior exemplo de perseverança e força. Em você eu vejo o poder de Deus em nossas vidas e o poder da fé e da oração. Te amo, mãe!

Ao meu amado e querido pai, **Antônio Carlos**, *in memoriam*, por sempre ter acreditado no meu potencial. Ele trabalhou até onde pôde para dá a mim e aos meus irmãos acesso à educação e uma vida com dignidade. Com muito esforço e trabalho árduo abriu caminho para que eu pudesse trilhar meus sonhos. Ele me ensinou o valor da educação e nunca mediu sacrifícios para que eu e meus irmãos tivéssemos as oportunidades que ele não teve. Os meus estudos foi a maior riqueza que ele me deixou e este trabalho também é fruto da sua dedicação. Levo comigo no coração seus exemplos, ensinamentos e honra. Te amo, pai!

Aos meus irmãos, **Bárbara Barbosa** e **Hugo Barbosa**, por sempre me apoiarem e torcerem positivamente por mim. Vocês são essenciais na minha vida e agradeço a Deus por tê-los ao meu lado. Cada conquista minha é também de vocês, pois foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Obrigada por acreditarem em mim, por me ajudarem a manter o equilíbrio e por serem meu porto seguro. Este trabalho também pertence a vocês. Amo vocês!

Aos meus amigos **Nathália Rúbia, Jéssica Fatel, Amanda Cristina, Gabriele Vargas, Alynne Gouveia e Érika Borges** por todo apoio e carinho.

À **Profa. Dra. Taia Rezende** por ter me recebido no grupo Biodonto com tanto carinho desde o início da minha iniciação científica até hoje com sua orientação no Mestrado. Te agradeço por todas as oportunidades que a senhora me concedeu ao longo deste período. Por sua impecável orientação que não apenas me inspiraram, mas também ampliaram meus horizontes acadêmicos e fortaleceram minha capacidade de contribuir para a ciência. Admiro a sua vasta experiência e profundo conhecimento, que cativam em nós a busca de um olhar mais crítico e questionador. Este trabalho é um reflexo da sua contribuição e do seu compromisso com avanço da pesquisa científica

Aos membros da banca avaliadora, **Dra. Poliana Amanda e Dr. Jacy Ribeiro** e à suplente **Dra. Stella Maris** por terem aceitado fazer parte deste momento tão significativo para mim. Vocês são professores que muito admiro pelo compromisso com a ciência e a educação. É uma honra contar com a expertise e dedicação de cada um de vocês nesta etapa da minha jornada acadêmica.

Aos professores **Profa. Dra. Liliana Rezende, Profa. Dra. Fernanda Garcia e Prof. Dr. Júlio Franco**, por terem me recebido tão bem no projeto de extensão de Trauma Dental da Universidade de Brasília. O projeto é uma ação fantástica que eu tenho a honra e o privilégio de participar. Não posso mensurar o quanto é enriquecedora a experiência de estar com vocês atuando de forma efetiva e com qualidade no tratamento dos pacientes que sofreram trauma dental.

Aos professores **Profa. Dra. Mikaela Kogawa e Prof. Dr. Rodrigo Medeiros** por terem aberto as portas do projeto de extensão de DTM e Dor orofacial da Universidade de Brasília. Agradeço também aos colegas que fiz, que estavam envolvidos no projeto, pela oportunidade de aprendizado e pelas valiosas experiências práticas.

Ao grupo **Biodonto**. A convivência com colegas e pesquisadores tão dedicados é uma fonte constante de inspiração e crescimento. As discussões enriquecedoras, as trocas de conhecimento e o espírito de cooperação científica foram essenciais ao longo dessa jornada.

À **Jade Ormondes**, por ter me recebido com carinho quando eu fui sua aluna de iniciação científica. Tenho muita admiração pela jornada que você construiu no grupo Biodonto.

À amiga que o laboratório me deu, **Mayara Oliveira**, cuja amizade e apoio foram essenciais. O laboratório, que nos aproximou, se tornou um espaço não apenas de pesquisa, mas também de trocas enriquecedoras, risadas e apoio mútuo durante as dificuldades que encontramos.

À grata surpresa da amizade da **Raquel Ramos**, por sempre ter uma palavra positiva, pelo bom humor e incentivo. Sou grata pela sua amizade e por todo apoio ao longo deste trabalho.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica **Gabriel Hansel, Ana Laura e Chrislaine Dias** por toda ajuda, parceria e comprometimento. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Johnny Carvalho** por toda disponibilidade e ajuda com o experimento final.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** da Universidade de Brasília por todas as oportunidades e por todas as portas que me foram abertas. Minha eterna admiração por esse programa que capacita, investe e dá oportunidades para seus alunos.

Ao **Programa Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia** da Universidade Católica de Brasília pelo acolhimento e pela disponibilidade da estrutura.

Aos colaboradores do Hospital Universitário de Brasília **Teresinha, Maria, Elizete e Jones** por toda gentileza e carinho.

Ao **Prof. Dr. Felipe Saldanha**, à **Elizabete** e ao **Departamento de Farmácia**, da Universidade de Brasília por toda contribuição na execução dos experimentos de PCRs.

Aos colegas **Samuel Lima, Ruben Martin, Harry e Rosiane Costa** pelo apoio e a disposição em ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (**FAPDF**), pelo auxílio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

“Não te ordenei que sejas forte e corajoso?
Não tenhas medo, não te acovardes, pois o
Senhor, teu Deus, estará contigo por onde quer que vás”.

(Js 1,9)

RESUMO

O tratamento endodôntico busca reduzir o número e virulência dos microrganismos dos canais radiculares e prevenir reinfecções, porém devido à complexidade anatômica dos sistemas de canais radiculares, perfurações ou falha no tratamento endodôntico podem ocorrer, necessitando, em alguns casos, de intervenções cirúrgicas. Neste contexto, os cimentos biocerâmicos de reparo destacam-se como alternativas promissoras devido à sua bioatividade e biocompatibilidade, favorecendo a regeneração tecidual e garantindo melhores resultados nos reparos endodônticos. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do MTA *Repair HP* (Angelus) e Bio C *Repair* (Angelus) e sua toxicidade, efeitos proliferativos, migratórios e imunomoduladores em culturas primárias de células do ligamento periodontal humano (hPDLs). Inicialmente foram preparados extratos dos cimentos reparadores em diferentes diluições (1:1, 1:2 e 1:4). A atividade antimicrobiana dos extratos dos cimentos de reparo foi testada avaliando sua concentração inibitória mínima para o crescimento de *E. faecalis* (ATCC 29212) e *C. albicans* (ATCC 10231). Posteriormente, a citotoxicidade dos extratos dos cimentos de reparo foi verificada em cultura de hPDLs utilizando o ensaio colorimétrico de MTT. Em seguida, a análise do efeito proliferativo e da migração foi avaliada em cultura de hPDLs pela técnica de exclusão de azul de *tripan* e ensaio de *scratch*, respectivamente. Por fim, avaliou-se, por qPCR, o efeito dos cimentos reparadores na expressão gênica dos fatores de necrose tumoral das citocinas pró-inflamatórias (*TNF- α*), interleucina (*IL*)-1 β e *IL*-6 e da citocina reguladora *IL*-10, em diferentes situações experimentais. Os resultados demonstraram que o extrato do cimento Bio C *Repair* (Angelus) (1:1) e sua diluição (1:2) apresentaram 46,56% e 9% de inibição do crescimento de *E. faecalis* (ATCC 29212), respectivamente, enquanto o extrato do MTA *Repair HP* (Angelus) não detectou nenhuma atividade antimicrobiana contra estes microrganismos testados. Nenhuma diluição testada de nenhum dos materiais foi tóxica para hPDLs, permitindo uma viabilidade mínima de 99,65%. Além disso, ambos os extratos dos cimentos de reparo promoveram maior proliferação e migração celular em suas diluições (1:2 e 1:4) em relação ao controle, após 48h. Eles também regularam negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (*IL*-6, *IL*-1 β , *TNF- α*) e mantiveram a expressão da citocina imunomoduladora *IL*-10, em condições inflamatórias. Portanto, Bio C *Repair* (Angelus) apresentou atividade antimicrobiana limitada, enquanto ambos os cimentos demonstraram biocompatibilidade e promoveram proliferação e migração celular. Além disso, modularam a resposta inflamatória, reforçando seu potencial para reparos endodônticos.

Palavras-chave: Biocerâmico. Cimento reparador. Atividade antimicrobiana. Biocompatibilidade. Bioatividade.

ABSTRACT

Endodontic treatment seeks to reduce microorganisms' number and virulence factors from the root canals and prevent reinfections, however due to the anatomical complexity of root canal systems, perforations or failure in endodontic treatment can occur, requiring surgical interventions in some cases. In this context, bioceramic repair sealers stand out as promising alternatives due to their bioactivity and biocompatibility, favoring tissue regeneration and ensuring better results in endodontic repairs and apical sealings. Therefore, this study aimed to evaluate the antimicrobial potential of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) and its toxicity, proliferative, migratory and immunomodulatory effects on primary cultures of human periodontal ligament cells (hPDLCs). Initially, extracts of repair sealers were prepared in different dilutions (1:1, 1:2 and 1:4). The antimicrobial activity of repair sealers extracts was tested by evaluating its minimum inhibitory concentration for *E. faecalis* (ATCC 29212) and *C. albicans* (ATCC 10231) growth. Subsequently, the cytotoxicity of the repair sealers extracts was verified in hPDLCs culture using the MTT colorimetric assay. Then, the analysis of proliferative effect and migration was evaluated in hPDLCs culture by tripin blue exclusion technique and scratch assay, respectively. Finally, the effect of repair sealers on gene expression was evaluated by qPCR, of pro-inflammatory cytokines' *tumor necrosis factors (TNF- α)*, *interleukin (IL)-1 β* , and *IL-6* and the regulatory cytokine *IL-10*, in different experimental situations. Results demonstrated that Bio C Repair (Angelus) sealer extract (1:1) and its dilution (1:2) showed 46.56% and 9% inhibition of *E. faecalis* (ATCC 29212) growth, respectively, while the MTA Repair HP (Angelus) extract did not detect any antimicrobial activity against these tested microorganisms. No tested dilution of either material was toxic to hPDLCs, allowing a minimum viability of 99.65%. In addition, both repair sealers extracts led to greater cell proliferation and migration in their dilutions (1:2 and 1:4) compared to control, after 48h. They also down regulated the expression of pro-inflammatory cytokines (*IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α*) and maintaining the expression of the immunomodulatory cytokine *IL-10*, under inflammatory conditions. Therefore, Bio C Repair (Angelus) showed limited antimicrobial activity, while both sealers demonstrated biocompatibility, and promoted cell proliferation and migration. Additionally, they modulated the inflammatory response, supporting their potential for endodontic repairs and apical sealing.

Keywords: Bioceramics. Repair sealer. Antimicrobial activity. Biocompatibility. Bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figuras da Dissertação

Não aplicável

Figuras do Capítulo 1 - Manuscript

Figure 1: hPDLCs viability by MTT assay. hPDLCs viability after 24h of incubation with MTA Repair HP (A) and Bio C Repair (B) extracts (1:1, 1:2 and 1:4), after 24h. Graphs represent the mean and standard deviation of the absorbance of three biological replicates performed in technical triplicates. No statistical differences were found by ANOVA and Tukey post-test.

Figure 2: Cell migration and proliferation assays in hPDLCs. Cell migration was evaluated in contact with MTA Repair HP extract (1:1, 1:2 and 1:4), and Bio C Repair extract (1:1, 1:2 and 1:4) at 0h, 24h and 48h (A). Number of cells in contact with MTA Repair HP extract (1:2 and 1:4), and with Bio C Repair extract (1:2 and 1:4) that migrated to the wound. * $p < 0.05$ in 24h and 48h, respectively, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to control group. (B) Proliferation of hPDLCs using the trypan blue method after 24h and 48h in contact with MTA Repair HP extracts (1:1, 1:2 and 1:4), and Bio C Repair extract (1:1, 1:2 and 1:4). * $p < 0.05$ represents statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to control group after 24 and 48h. (C) Representative image of cell migration test. Dots indicate the presence of cells in the wound.

Figure 3: *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, and *IL-10* genes expression, by hPDLCs. Cells when exposed to MTA Repair HP (1:1), and Bio C Repair (1:1) in different conditions: basal (A, D, G and J), stimulated with LPS (B, E, H and K) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and LPS plus IFN- γ (C, F, I and L) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), after 24h of incubation. Graphs represent mean and standard deviation of three biological replicates in technical triplicate. * $p < 0.05$ represents statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to control group.

Supplementary figure 1: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS/MS) spectra of the fresh prepared MTA Repair HP and its diluted extracts. The mass spectra were acquired in reflective mode with a mass range of 20–1000 (m/z).

Supplementary figure 2: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS/MS) spectra of the fresh prepared Bio C Repair and its diluted extracts. The mass spectra were acquired in reflective mode with a mass range of 20–1000 (m/z).

Supplementary figure 3: UV/VIS absorption spectra of the fresh prepared cement and its diluted extracts: (A) MTA Repair and (B) Bio C Repair. Water was used as control.

Supplementary figure 4: Cell migration and proliferation essays in hPDLs. Cell migration was evaluated in contact with MTA Repair HP and Bio C Repair extracts (1:1), after 24 and 48h. (A) Number of cells in contact with non-diluted MTA Repair HP and Bio C Repair extract that migrated to the wound after 24h and 48h. No statistical differences were found by ANOVA and Tukey's post-test. (B) Proliferation of hPDLs by the trypan blue method after 24h. * $p < 0.05$ represents statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to the control group at 48h. (C) Representative image of the cell migration test. Dots indicate the presence of cells in the wound.

LISTA DE TABELAS

Tabela da Dissertação

Tabela 1: MTA *Repair HP* e Bio C *Repair*: Composição, indicações e propriedades.

Tabela 2: Sequência de primers para cada gene usado no ensaio de PCR.

Tabela do Capítulo 1 – Manuscript

Table 1: Primer sequence for each gene used in the qPCR assay.

Table 2: MTA Repair HP components.

Table 3: Bio C Repair components.

Table 4: Antimicrobial activity carried out in technical and biological triplicates of MTA Repair HP and Bio C Repair sealers extract against *E. faecalis* and *C. albicans in vitro*. Positive control was represented by ampicillin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *E. faecalis* and amphotericin B 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, for *C. albicans*. Bactericidal and fungicidal tests are also represented. Undiluted (1:1) and diluted (1:2) Bio C Repair sealer extract showed a percentage of *E. faecalis* growth inhibition of 46,56% and 9%, respectively.

ND: Not detected.

Table 5: pH assessment of MTA Repair HP and Bio C Repair extracts.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

ANEXO B - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO NA REVISTA *BRAZILIAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES* (QUALIS A3 CAPES).

ANEXO C - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO NA REVISTA *BRAZILIAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES* (QUALIS A3 CAPES).

ANEXO D - ARTIGO PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO COMO COLABORADORA NA REVISTA *JOURNAL OF ENDODONTICS* (QUALIS A1 CAPES).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP – fosfatase alcalina

ATCC – coleção de cultura do tipo americano (*American Type Culture Collection*)

CEP – comitê de ética em pesquisa

CLSI - *clinical and laboratory standards institute*

CO₂ – dióxido de carbono

DMEM - meio *eagle* modificado por *dulbecco* (*Dulbecco's Modified Eagle's Médium*)

DMSO – dimetilsulfóxido

EBA - óxido de zinco e eugenol reforçado

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

hPDLs – células do ligamento periodontal humano (*human periodontal ligament cells*)

IFN- γ - interferon gama (*interferon-gamma*)

IGF - fator de crescimento semelhante a insulina

IL – interleucina (*interleukin*)

IRM – material restaurador intermediário

ISO - organização internacional de padronização (*International Organization for Standardization*)

LPS – lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide*)

LTA - ácido lipoteicoico

MALDI-ToF – Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*)

MBC – concentração bactericida mínima (*Minimum Bactericidal Concentration*)

MFC – concentração fungicida mínima (*Minimum Fungicidal Concentration*)

MHB – meio *Mueller Hinton* (*Mueller Hinton Broth*)

MIC – concentração inibitória mínima (*Minimum Inhibitory Concentration*)

MTA – agregado trióxido mineral (*Mineral Trioxide Aggregate*)

MTT - Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (3-(4,5-dimethylthia 2yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NK - *natural killer*

OPG - osteoprotegerina

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction*)

qPCR – reação de Polimerização em Cadeia em tempo Real (*real time Polimerase Chain Reaction*)

RANK - receptor do ativador do fator nuclear Kappa B

RANKL – ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B

RNA - ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SCR – sistema de canais radiculares

SFB/FBS – soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β – fator de crescimento transformador- β (*Transforming Growth Factor- β*)

TNF - fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Fator*)

TNF- α - fator de necrose tumoral- α (*Tumor Necrosis Factor- α*)

TNFRSF1 – receptor do fator de necrose tumoral 1

Treg – linfócitos T regulatórios

UCB - Universidade Católica de Brasília (*Catholic University of Brasília*)

UnB – Universidade de Brasília

UFC/CFU – unidade formadora de colônia (*Colony Forming Unit*)

SUMÁRIO

1. PREFÁCIO	19
2. INTRODUÇÃO	20
2.1 INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO	20
2.2 CIMENTOS BIOCERÂMICOS REPARADORES	25
2.3 PERFURAÇÕES RADICULARES E SEU TRATAMENTO	31
2.4 CIRURGIA PARENDODÔNTICA E SEU TRATAMENTO	36
2.5 BIOATIVIDADE DOS BIOCERÂMICOS DE REPARO	39
3. OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. MÉTODOS	45
4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA	45
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	45
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	46
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	47
4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS	47
4.6 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE MTA <i>REPAIR HP</i> E BIO C <i>REPAIR</i> CONTRA <i>E. FAECALIS</i> E <i>C. ALBICANS</i>	48
4.7 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO	49
4.8 VIABILIDADE DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DO MTA <i>REPAIR HP</i> E DO BIO C <i>REPAIR</i>	49
4.9 MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DO MTA <i>REPAIR HP</i> E DO BIO C <i>REPAIR</i>	50
4.10 EXPRESSÃO GÊNICA INFLAMATÓRIA E ANTI-INFLAMATÓRIA POR CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DO MTA <i>REPAIR HP</i> E DO BIO C <i>REPAIR</i>	50
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
5. CAPÍTULO 1: <i>Manuscript</i>	52

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
7. REFERÊNCIAS (Dissertação: Introdução e Métodos)	87
8. ANEXOS	111
8.1 ANEXO A	111
8.2 ANEXO B	113
8.3 ANEXO C	114
8.4 ANEXO D	115

1. PREFÁCIO

A evolução da endodontia tem sido marcada por avanços significativos no desenvolvimento de materiais que não apenas melhoram a longevidade dos tratamentos, mas também favorecem a reparação tecidual e a saúde periapical. Entre essas inovações, os cimentos biocerâmicos têm se consolidado como uma revolução na especialidade, trazendo novas perspectivas na atividade físico-química dos materiais.

Neste cenário, o MTA *Repair HP* (Angelus, Londrina, Brasil) e o Bio C *Repair* (Angelus, Londrina, Brasil) surgem como alternativas promissoras, com perspectivas de propriedades antimicrobianas, excelente capacidade de selamento e estímulo à regeneração tecidual. Assim, este estudo se propõe a investigar, de maneira aprofundada, o comportamento desses cimentos frente às células do ligamento periodontal humano (hPDLCs), analisando seu potencial antimicrobiano, sua citotoxicidade e influência na resposta de reparo biológico bem como a resposta imune. Os resultados contribuirão para ampliar o conhecimento sobre esses materiais, fornecendo subsídios para uma prática endodôntica cada vez mais segura e eficiente.

Para tanto, esta dissertação de Mestrado foi estruturada no formato de capítulo, contendo: Introdução, Objetivos, Materiais e Métodos, Capítulo 1, Considerações finais, Referências e Anexos. No Capítulo 1 "*Manuscript*" encontra-se o artigo preparado com os resultados desta dissertação, de acordo com o *Guideline* da revista *International Endodontic Journal* (IF: 5.4, A1 CAPES), periódico para o qual pretendemos submeter este trabalho. Nos anexos, encontra-se: a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa, artigos aceitos para publicação e publicado.

2. INTRODUÇÃO

2.1 INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

A polpa dentária é formada por meio da diferenciação das células ectomesenquimais da papila dentária. Este tecido está localizado no interior das paredes dentárias rígidas e é constituído por células especializadas e indiferenciadas, com funções nutritiva, formadora e sensitiva. Diversos estímulos, seja ele biológico ou traumático, podem promover a perda da integridade dos tecidos dentários duros e assim, torna-se uma via mais acessível para a infecção onde irá provocar alterações acentuadas na polpa dental (Xie *et al.*, 2021). Os produtos metabólicos bacterianos possuem a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários expostos e gerar uma resposta imune à polpa dentária (Gomes & Herrera, 2018). Assim, a atividade do sistema imune irá determinar o progresso da infecção para outros tecidos (Somma *et al.*, 2011).

Em resposta a um dano tecidual, a polpa é capaz de estimular um processo inflamatório como uma reação de defesa do tecido agredido (Zanini *et al.*, 2017). Conforme o agente agressor entra em contato com a polpa, a resposta inflamatória pode apresentar um grau de severidade condizente com a intensidade do agente agressor (Zhan *et al.*, 2021). Com o desenvolvimento da patologia endodôntica, a inflamação pode evoluir de uma hiperemia para um estágio de necrose pulpar tecidual. Nesta fase, os microrganismos, colonizam o sistema de canais radiculares (SCR) e tecidos perirradiculares causando injúrias teciduais. Assim, desencadeia-se uma série de respostas frente aos agentes infecciosos, capazes de formar lesões perirradiculares (Galler *et al.*, 2021).

A imunidade inata e adaptativa são linhas de defesa contra as infecções microbianas. A imunidade inata age combatendo os microrganismos por meio da produção e expansão dos mediadores inflamatórios através da ação dos macrófagos, essa ação tem o propósito de atrair as células de defesa para área que houve a agressão e causar modificações (Jang *et al.*, 2015). Os principais mediadores inflamatórios presentes durante a imunidade inata são as citocinas, os componentes do sistema complemento, a bradicinina, o óxido nítrico, os radicais oxigenados e os neuropeptídeos. Além desses fatores, as bactérias Gram-negativas liberam da sua membrana externa lipopolissacarídeos (LPS) que possuem alto potencial tóxico e está

diretamente ligado aos episódios de infecção, uma vez que, quando esses produtos migram do tecido pulpar em elevadas concentrações para a região periapical, estimulam a produção de quimiocinas que ativam a migração das células inflamatórias (Saoud *et al.*, 2016). A persistência bacteriana diante da ação da imunidade inata progride para um quadro de inflamação aguda e evolui para uma inflamação crônica adquirindo aspectos de uma inflamação secundária (Metzger *et al.*, 2009). Pesquisas indicam que nessa etapa, a composição microbiana se difere da encontrada durante a infecção endodôntica aguda. Durante a fase crônica, tende a ter uma diversidade reduzida de microrganismos, com uma predominância de espécies anaeróbicas facultativas Gram-positivas (Adib *et al.*, 2004).

Embora a vasta maioria dos microrganismos encontrados em infecções endodônticas sejam bactérias, há também relatos da presença de fungos, arqueias e vírus nos SCR (Siqueira & Rôças, 2008). A literatura relata que os fungos, principalmente da espécie *Cândida*, foram detectados em infecções primárias. As arqueias, que são procariotos distintos das bactérias, foram identificadas nos registros clínicos de dentes com lesões perirradiculares crônicas. Além disso, a presença dos vírus também foi constatada em lesões perirradiculares, sendo implicada na etiopatogenia dessas lesões, tanto por meio de uma ação direta da infecção viral, quanto por meio de um mecanismo indireto que compromete as defesas locais e favorece a proliferação bacteriana na região apical do canal radicular (Siqueira & Rôças, 2008).

Nesse processo inflamatório crônico presente nas lesões perirradiculares, os linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD30⁺, macrófagos, células do plasma, eosinófilos e *natural killer* (NK) agem na fagocitose das células mortas e contra os microrganismos para evitar a progressão da infecção (Martinho *et al.*, 2014). Assim, para evitar uma maior disseminação bacteriana, o sistema de defesa do hospedeiro age como um anteparo atingindo os tecidos sadios ocasionando uma ruptura do ligamento periodontal e uma reabsorção óssea (Paula-Silva *et al.*, 2020).

Quando a reabsorção óssea é desencadeada, os macrófagos e os monócitos se diferenciam em osteoclastos mediado pelo ligante do receptor de ativação fator nuclear Kappa B (RANKL). O RANKL é uma molécula que está presente na superfície das células do estroma e dos odontoblastos e possuem a função de diferenciação de precursores dos osteoclastos (Wittrant *et al.*, 2008). Entretanto, a osteoprotegerina (OPG) é um receptor oriundo dos odontoblastos, presentes no ligamento periodontal

e no tecido epitelial, que possui a capacidade de se ligar ao RANKL. Sua função é bloquear a osteoclastogênese através da disputa pelo RANK (Menezes *et al.*, 2006). Sendo assim, a quantidade de osso a ser reabsorvido depende do equilíbrio da expressão entre o RANKL e a OPG (Wang *et al.*, 2015).

A reabsorção óssea ocorre por meio da ativação dos osteoclastos, essa ativação ocorre mediante a liberação de citocinas que são produzidas pelos linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) como o fator de necrose tumoral (*TNF- α*), IFN- γ , IL-2 e IL-12 e por outro lado, os mediadores inflamatórios produzidos pelos linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) como o IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 agem inibindo o processo inflamatório e de reabsorção óssea (Martinho *et al.*, 2014). Além disso, as células T regulatórias (Treg) possuem a função de regular a resposta imune anti-inflamatória que induz no processo de reparo das lesões perirradiculares por meio da produção de IL-10 e do fator de crescimento transformador (TGF- β) (Graves *et al.*, 2011). Em adição, as células Th17 produzem IL-17 que também estão presentes no processo de proteção da lesão óssea perirradicular por meio da indução do processo inflamatório e do deslocamento de linfócitos para a área afetada (AlShwaimi *et al.*, 2013).

Assim, as pesquisas comprovam as diversas maneiras pelas quais os mediadores inflamatórios agem no ambiente perirradicular e diante dessas circunstâncias, o tratamento endodôntico tem como principal objetivo o controle e redução dos microrganismos presentes no SCR (Sullivan *et al.*, 2016). Dessa forma, os elementos que influenciam positivamente no resultado do tratamento englobam a capacidade de resposta do hospedeiro e a excelência do procedimento em si (Cotti *et al.*, 2014). No entanto, as condições patológicas podem persistir mesmo após a finalização da terapia endodôntica, exigindo a realização de uma nova intervenção (Eliyas *et al.*, 2014). A presença de microrganismos no espaço pulpar e perirradicular apresenta característica persistente e acarreta patologias que são capazes de se perpetuarem (Siqueira *et al.*, 2008). A persistência de microrganismos e de seus produtos metabólicos possibilita a continuidade do processo inflamatório e o insucesso do tratamento endodôntico, uma vez que, o reparo das estruturas perirradiculares e a recomposição da função dentária não são restabelecidas (Siqueira & Rôças, 2008).

Dentre os mais variados microrganismos presentes nas infecções de origem endodôntica e presentes nos dentes tratados endodonticamente, a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* possui alto valor de prevalência, podendo chegar a

90% (Rôças *et al.*, 2004). Estudos apontam que nos casos de insucesso do tratamento endodôntico há maior prevalência deste microrganismo do que nos casos de infecção primária. Essa prevalência tem-se mostrado pelas alterações ecológicas do canal radicular após a ineficiência do preparo químico-mecânico ou pela obturação deficiente (Alghamdi, 2020). O ácido lipoteicoico (LTA), um componente produzido pela *E. faecalis* e outras bactérias Gram-positivas, desempenha um papel crucial como fator de virulência, que contribuiu para a formação e permanência das condições patológicas periapicais (Costa *et al.*, 2003). Pesquisas envolvendo o LTA revelaram modificações nos tecidos, tais como a reabsorção óssea, a liberação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, assim como de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos e macrófagos, além da regulação e ativação dos neutrófilos (Ryu *et al.*, 2009).

A resistência bacteriana evolui para uma inflamação aguda e posteriormente, adquire aspectos crônicos. O estágio da inflamação é definido pelos tipos celulares presentes no local afetado. Durante a inflamação aguda, há um acúmulo de neutrófilos, enquanto na inflamação crônica, há presença das células mononucleares com a predominância dos linfócitos seguido de plasmócitos e macrófagos (Graunaite *et al.*, 2012).

A segunda maior causa do insucesso da terapia endodôntica são as perfurações radiculares cometidas pelos cirurgiões dentistas durante o tratamento endodôntico (Haji-Hassani *et al.*, 2015). A literatura demonstra que as perfurações representam 2 a 12% dos acidentes na área endodôntica. A falta de conhecimento da anatomia dentária atrelado com a inexperiência clínica pode causar esse tipo de iatrogenia (Kakani, 2015). Um estudo realizado com 55 perfurações acompanhadas por 11 anos constatou que 47% dessas perfurações radiculares foram acometidas ao tratamento endodôntico (Kvinnslund *et al.*, 1989). Além das perfurações iatrogênicas, aquelas decorrentes de processos patológicos, como lesões cariosas extensas e reabsorções radiculares, essas comunicações entre o canal radicular e os tecidos periodontais circundantes também podem comprometer o prognóstico do tratamento endodôntico (Cohen *et al.*, 2011). De uma forma geral, o tratamento das perfurações radiculares varia de acordo com sua localização e a viabilidade de acesso direto no local acometido. O tratamento efetivo deve abranger sua localização, descontaminação e seu preenchimento com material endodôntico biocompatível (Balasubramaniam *et al.*, 2017). As taxas de sucesso após o tratamento das

perfurações têm evidenciado um crescimento satisfatório que varia em torno de 80 a 90%, porém em alguns casos ainda ocorrem insucessos neste tratamento (Tabassum, 2016).

Outra possibilidade de falha no tratamento endodôntico convencional está relacionada a persistência de contaminação microbiana (Gunnel, 2004). Nesta situação, dois procedimentos podem ser realizados: o retratamento endodôntico e a cirurgia parendodôntica. Estudos mostram que as taxas de sucesso do retratamento endodôntico é em torno de 83% pelo período de acompanhamento de 4 a 6 anos (Torabinejad, 2016). Mas, em casos em que o retratamento endodôntico não é possível de ser realizado, seja por difícil acesso aos canais radiculares em dentes com lesão periapical ou dentes com canais calcificados, obstruídos ou perfurados, a cirurgia parendodôntica é necessária (Ho *et al.*, 2017). Estudos apontam uma taxa de sucesso ainda maior quando comparado ao retratamento endodôntico, essa taxa está acima de 88% de sucesso em casos acompanhados pelo período de 4 a 6 anos (Torabinejad, 2016). Um estudo envolvendo acompanhamento de longo prazo demonstrou resultados semelhantes de sucesso envolvendo procedimentos de retratamento e cirurgia parendodôntica (Alghamdi *et al.*, 2020). Em um estudo de coorte realizado por Öğütlü & Karaca (2018), uma taxa de sucesso de 88,4% nas cirurgias apicais, foi observada.

Dessa forma, o uso dos biocerâmicos de reparo são hoje a primeira escolha em casos de selamento de perfurações (Mente *et al.*, 2014). Assim, é desejável que estes biomateriais sejam biocompatíveis e apresentem atividades imunomodulatórias, antibacterianas e sejam bioativos nos processos de deposição óssea (Lima *et al.*, 2014). Antes do surgimento dos materiais biocerâmicos, casos de insucesso da terapia endodôntica muitas vezes resultavam na perda do elemento dentário. Fato justificado pois os materiais previamente utilizados para o vedamento, não apresentavam capacidade de interação com os tecidos circundantes, além de apresentarem um elevado potencial de citotoxicidade.

Atualmente, os novos materiais utilizados na terapia endodôntica buscam mudanças em sua composição e formulação visando superar as características físico-químicas adversas de outros materiais. Neste contexto, novos cimentos de reparo devem possuir boa biocompatibilidade e potencial bioativo para potencializar a interação do material com os tecidos circundantes do elemento dentário (Alves Silva *et al.*, 2020). Atrelado a isso, nos últimos anos ocorreu uma verdadeira transformação

no campo da especialidade endodôntica, graças a introdução de inovações tecnológicas. Além dos biomateriais outras inovações na área da Endodontia como o uso dos localizadores apicais eletrônicos, uso de ultrassom, uso de instrumentos rotatórios e reciprocantes, bem como a microscopia eletrônica permitiram grandes avanços com uma endodontia mais segura e precisa.

2.2 CIMENTOS BIOCERÂMICOS DE REPARO

Os cimentos endodônticos biocerâmicos de reparo representam uma classe de materiais de uso mais recente na endodontia. Estes apresentam crescente reconhecimento e adoção entre os profissionais da odontologia. Eles foram desenvolvidos com base em avanços tecnológicos na ciência dos materiais e tem como principal objetivo proporcionar uma melhor resposta biológica e propriedades físico-químicas superiores em comparação com os materiais utilizados anteriormente, como o Óxido de Zinco e Eugenol e o Agregado Trióxido Mineral (MTA), que, apesar de amplamente empregados, apresentavam limitações como maior tempo de presa e dificuldade de manuseio em algumas situações clínicas (Koch *et al.*, 2010). Uma das principais características distintas dos biocerâmicos quando comparados com os materiais da primeira geração, que ainda estão disponíveis no mercado, é a sua composição a base de minerais, que inclui elementos como silicato de cálcio, fosfato tricálcio, aluminato tricálcio e outros compostos cerâmicos (Zhang *et al.*, 2010). Essa combinação de minerais confere aos biocerâmicos reparadores características únicas, como biocompatibilidade, capacidade de induzir regeneração tecidual e excelente selamento marginal (Balasubramaniam *et al.*, 2017).

A biocompatibilidade desses materiais é uma propriedade crucial, pois garante que o tecido periapical e a polpa dentária sejam bem tolerados pelo material, minimizando reações inflamatórias e favorecendo a cicatrização dos tecidos após o tratamento endodôntico (Benetti *et al.*, 2019). Além disso, a capacidade de estimular a regeneração tecidual é particularmente valiosa em casos de lesões periapicais, permitindo uma recuperação mais rápida e eficiente (Abu Zeid *et al.*, 2017). A outra característica importante atribuída a esse biomaterial é sua capacidade de selamento marginal que se torna fundamental para evitar a infiltração bacteriana e a reinfecção dos canais radiculares, garantindo o sucesso a longo prazo dos tratamentos endodônticos. O selamento eficaz também contribui para a redução de complicações

e melhora a previsibilidade dos resultados clínicos (Giacomino *et al.*, 2019). Suas aplicações clínicas são variadas, tornando-os um componente essencial na prática odontológica moderna. Esses biomateriais são frequentemente utilizados em procedimentos endodônticos, como reparo de perfurações radiculares, apicectomia, tratamento de perfurações de furca e apexificação (Koch *et al.*, 2010).

A primeira geração do cimento de reparo desenvolvido foi o Agregado de Trióxido Mineral (MTA). O MTA é um material inovador e altamente versátil amplamente utilizado na área odontológica, especialmente na endodontia. Foi desenvolvido na década de 1990 pelo Doutor Mahmoud Torabinejad e sua equipe na Universidade de Loma Linda (Califórnia, Estados Unidos). O primeiro produto comercial desenvolvido a partir do MTA foi o ProRoot MTA (Denstsply/De Trey GmbH, Konstanz, Germany), que originalmente tinha uma tonalidade cinza e continha metais em sua composição. Esse produto apresentava algumas limitações, como difícil manuseio devido a sua consistência arenosa, longo tempo de presa e causava alterações de cor nos dentes tratados (Torabinejad *et al.*, 2010). Posteriormente, foi lançada uma versão branca, MTA Branco (Angelus, Londrina, PR, Brasil), livre de alumínio e arsênico, abrindo caminho para os cimentos mais puros, a base de silicato de cálcio, substituindo a fórmula original do cimento Portland (Camilleri, 2015). De acordo com a literatura, a versão branca possui a capacidade de manter um pH elevado, o que contribui para a reparação e a formação de um tecido mineralizado (Hansen *et al.*, 2011). Algumas das suas principais aplicações clínicas incluem: capeamento pulpar direto e indireto, reparo de perfurações, tratamento de reabsorção externa e interna, apexificação, tratamento de perfurações radiculares, pulpotomia em dentes permanentes e decíduos e apicectomia. Entretanto, estes cimentos ainda apresentavam algumas limitações, especialmente no que diz respeito a manipulação, ao potencial de causar manchas nos dentes e ao longo tempo de presa (Mooney *et al.*, 2008).

Com o objetivo de superar essas desvantagens, tem sido realizado aprimoramentos e modificações na composição original dos cimentos que apresentam uma base semelhante ao MTA (Raghavendra *et al.*, 2017). Os resultados revelaram vantagens nos tratamentos endodônticos, especialmente em termos de facilidade de uso, capacidade osteoindutiva e osteoindutora (Fillingham *et al.*, 2016). E outros fatores como o vedamento, a formação de ligação química com a dentina e a resposta biológica favorável (Benetti *et al.*, 2019). Além disso, foi possível categorizá-los em

termos de bioatividade e bioinertidade, com base em sua capacidade de interagir com os tecidos. Os materiais bioativos, como os biocerâmicos, têm a propriedade de estimular o processo de reparação tecidual, enquanto os bioinertes não possuem efeitos fisiológicos ou biológicos (Best *et al.*, 2008).

Os cimentos biocerâmicos são materiais odontológicos avançados que combinam características de cimentos e cerâmicas. Eles são utilizados principalmente em procedimentos endodônticos que exigem um material de preenchimento ou selamento de alta qualidade. Esses cimentos são compostos por uma mistura de diferentes partículas cerâmicas, geralmente óxidos de silício, alumínio, cálcio e outros elementos (Zhang *et al.*, 2010). Eles podem incluir também vidro bioativo e materiais de base mineral, que lhes confere propriedades especiais como biocompatibilidade, capacidade de formação de uma interface resistente com os tecidos do dente e estabilidade química (Raghavendra *et al.*, 2017). A transição dos cimentos endodônticos tradicionais para os biocerâmicos mais modernos foi impulsionada pelo avanço da pesquisa científica e tecnológica na área odontológica. Ao longo do tempo, os profissionais de odontologia perceberam a necessidade de desenvolver materiais que pudesse superar algumas limitações dos cimentos endodônticos tradicionais e oferecer benefícios adicionais aos pacientes. Dessa forma, uma diferença significativa na composição dos biocerâmicos mais recentes e o MTA original é a presença de óxidos de cálcio, carbonato de cálcio e fosfatos de cálcio. Ambos os materiais contêm silicatos de cálcio em suas composições, bem como agentes radiopacificadores e componentes de presa (Benetti *et al.*, 2019). Como parte dessa evolução, em 2009, foram introduzidos o Biodentine (Septodont, Saint Maurdes-Fosses, França) e Bioaggregate (Innovate BioCeramix Inc, Canadá) sendo algumas das primeiras opções de biocerâmicos reparadores desenvolvidos como alternativas ao MTA (Loushine *et al.*, 2011). A formulação desses materiais apresenta semelhanças com o MTA, pois tanto o Biodentine (Septodont), quanto o Bioaggregate (Innovate BioCeramix) são cimentos que possuem como base o silicato de cálcio. No entanto, há diferenças distintas entre eles, o Biodentine (Septodont) contém óxidos de cálcio, enquanto o Bioaggregate (Innovate Bioceramics) possui fosfatos de cálcio (Loushine *et al.*, 2011).

Apesar da melhoria desses produtos, eles ainda apresentavam algumas desvantagens e com o intuito de simplificar a manipulação e diminuir o tempo de presa dos biomateriais de reparo, foi desenvolvido o *Endosequence Root Repair* (Brasseler,

Savannah, GA, EUA). Esse produto foi desenvolvido para tomar presa quando exposto a um ambiente úmido, como a umidade encontrada nos túbulos dentinários (Zhang *et al.*, 2009). Disponível como produto pré-manipulado e com uma tonalidade branca, esse material é composto por óxido de zircônio, silicato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio e agentes espessantes (Darren *et al.*, 2011). Com o avanço da tecnologia e dos estudos científicos houve a necessidade de aprimorar ainda mais as características dos biocerâmicos endodônticos de reparo. A empresa brasileira Angelus desenvolveu o MTA Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brasil). Mas, apesar de ter sido bem aceito, ele apresentava algumas limitações relacionadas as características físicas inerentes ao pó do produto e a consistência granulosa que dificulta a manipulação e o transporte do material até a cavidade de reparo (Torabinejad *et al.*, 2010).

Diante da deficiência do produto e com o intuito de melhorar essa característica, uma nova formulação, MTA *Repair HP* (Angelus, Londrina, PR, Brasil), foi desenvolvida. Trata-se de um cimento reparador biocerâmico de segunda geração de alta plasticidade que preserva todas as propriedades químicas e biológicas do MTA convencional da primeira geração, porém com modificações em suas propriedades físicas (Tomás-Catalá *et al.*, 2017). Uma das principais modificações está na melhor manipulação e menor tempo de presa. Além disso, houve substituição do radiopacificador óxido de bismuto pelo tungstato de cálcio como radiopacificador, devido a registros na literatura de que o óxido de bismuto poderia estar associado a descoloração dentária, possível liberação de substâncias citotóxicas e baixa radiopacidade (Palczewska-Komsa *et al.*, 2021). Segundo o fabricante (Tabela 1), o MTA *Repair HP* (Angelus) é um produto de fácil manipulação e inserção na cavidade de reparo. Trata-se de um cimento biocerâmico endodôntico reparador com apresentação pó-líquido altamente plástico, que utiliza tungstato de cálcio como radiopacificador em sua composição, proporcionando radiopacidade adequada sem os efeitos adversos observados com o óxido de bismuto. Duas principais indicações são o tratamento de perfurações radiculares, seja por iatrogenia ou lesão de cárie, e em cirurgias parendodônticas (Palczewska-Komsa *et al.*, 2021). Um estudo realizado por Silva *et al.* (2021) utilizando os extratos do cimento biocerâmico MTA *Repair HP* (Angelus) demonstrou que as diluições deste biomaterial não foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *Streptococcus mutans*, mas foi capaz de reduzir o biofilme jovem e maduro de *S. mutans* quando diluído 1:1. Neste trabalho também foi avaliada

a viabilidade de células pulpares por meio do ensaio de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), após contato com diluições do MTA *Repair HP* (Angelus) e nenhuma das diluições testadas foi citotóxica para as células pulpares. Em um outro estudo, Silva *et al.* (2023) avaliaram a modulação da expressão do gene IL-6 em um ambiente inflamatório na presença dos peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs), MTA *Repair HP* (Angelus) e uma combinação dos dois. Após 24 horas, o peptídeo IDR1018 e a combinação de HDPs e MTA *Repair HP* (Angelus) reduziram a expressão de IL-6 em células da polpa dental inflamada. Além disso, quando o MTA *Repair HP* (Angelus) foi combinado com o peptídeo IDR1018, houve uma redução ainda maior na expressão de IL-6 em comparação com o MTA *Repair HP* (Angelus) sozinho.

Além deste produto, em meados de 2019 a empresa Angelus lançou o seu mais recente cimento reparador biocerâmico pronto para o uso de terceira geração, Bio C *Repair* (Angelus, Londrina, PR, Brasil). Esse material foi desenvolvido com a proposta de ser uma opção inovadora na reparação de tecidos endodônticos, devido à sua capacidade de indução da regeneração tecidual. Sua formulação inclui silicatos de cálcio, fosfato de cálcio, óxido de zircônio e dióxido de silício (Tabela 1), que contribuem para sua bioatividade e biocompatibilidade. A liberação de íons Ca^{2+} presentes na composição estimula a formação de tecido mineralizado, favorecendo a reparação das estruturas dentárias e o aumento do pH. Além disso, seu pH elevado pode ser relacionado com a atividade antimicrobiana, dificultando a infiltração bacteriana e promovendo a adesão química à dentina (Benetti F *et al.*, 2019). Em um estudo realizado por Maru *et al.* (2023) avaliou-se a viabilidade celular dos cimentos Bio C *Repair* (Angelus), MTA *Repair HP* (Angelus) e Biodentine (Septodont). A viabilidade celular foi maior para o Biodentine, seguido pelo Bio C *Repair* (Angelus) e MTA *Repair HP* (Angelus). Essa diferença pode ser atribuída a liberação de cálcio pelos materiais, sendo o Biodentine (Septodont) e o Bio C *Repair* (Angelus) capazes de liberar mais cálcio do que o MTA *Repair HP* (Angelus), conforme informado pelo fabricante (Tabela 1). A formação de hidróxido de cálcio é importante para a formação de uma barreira de dentina e a diferenciação dos cementoblastos. Os resultados sobre a viabilidade celular na presença dos extratos do cimento biocerâmico Bio C *Repair* (Angelus) em contato com as células-tronco derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs) demonstrou que todas as diluições testadas não apresentaram citotoxicidade no intervalo de tempo de 24, 48 e 72 horas. Porém, no período de 72

horas de incubação a diluição 1:4 do extrato do cimento apresentou maior viabilidade celular em comparação com o grupo controle. Por outro lado, um estudo realizado por López-García *et al.* (2019) relatou que o Bio C *Repair* (Angelus) apresentou proliferação celular comparável ao controle sem alteração substancial após 3 dias de incubação. Estudos anteriores demonstraram que tanto o MTA *Repair HP* (Angelus) quanto o Bio C *Repair* (Angelus) são biocompatíveis e possuem potencial para biomineralização quando expostos a células vivas (Benetti *et al.*, 2019).

Sendo assim, esses materiais de reparo têm demonstrado uma versatilidade para aplicação em uma ampla gama de casos clínicos, tornando-os uma ferramenta valiosa para o profissional da odontologia. No entanto, é essencial que os profissionais estejam familiarizados com suas características específicas e sigam rigorosamente as instruções de uso do fabricante para garantir resultados ótimos e previsíveis. Em suma, os cimentos endodônticos biocerâmicos de reparo representam uma importante evolução no tratamento endodôntico, oferecendo soluções mais avançadas e confiáveis para os procedimentos endodônticos de reparo. Sua composição a base de minerais, biocompatibilidade, capacidade de regeneração tecidual e selamento marginal superior fazem desses biomateriais serem grandes inovações tecnológicas para a odontologia.

Tabela 1 - MTA *Repair HP* e Bio C *Repair*. Composição, indicações e propriedades. Fonte: Angelus. Bula do MTA *Repair HP* e do Bio C *Repair* Londrina, Brasil: Angelus (Data de emissão: 10/02/2024). Disponível em:

https://angelus.ind.br/materiais/produtos/mta-repair-hp-ifu-eng.pdf?utm_campaign=auto_site_-_por_-_mta_repair_hp&utm_medium=email&utm_source=RD+Station

https://www.angelus.ind.br/materiais/produtos/bio-c-repair-ifu-eng.pdf?utm_campaign=auto_site_-_por_-_bio-c_repair&utm_medium=email&utm_source=RD+Station

Categoria	MTA <i>Repair HP</i>	Bio C <i>Repair</i>
Definição	Cimento endodôntico reparador de alta plasticidade, composto por óxidos minerais hidrofílicos	Cimento reparador biocerâmico pronto para o uso, indicado para reparo de complicações endodônticas
Indicações	1) Perfuração radicular (canal e furca) iatrogênica ou por lesão de cárie. 2) Perfuração radicular por reabsorção interna (via canal ou	1) Perfuração radicular (canal e furca) iatrogênica ou por lesão de cárie. 2) Perfuração radicular por reabsorção interna (via canal ou

	via cirúrgica). 3) Cirurgia parendodôntica com retrobturação. 4) Proteção pulpar direta. 5) Pulpotomia. 6) Apicigênese. 7) Apicificação.	via cirúrgica). 3) Cirurgia parendodôntica com retrobturação. 4) Proteção pulpar direta. 5) Pulpotomia. 6) Apicigênese. 7) Apicificação.
Composição	Pó: Silicato de tricálcio (3CaO.SiO ₂). Silicato de dicálcio (2CaO.SiO ₂). Aluminato tricálcio 3CaO.Al ₂ O ₃). Óxido de cálcio (CaO). Tungstato de cálcio (CaWO ₄). Líquido: Água e plastificante.	Silicato de cálcio (Ca ₂ O ₄ Si). Aluminato de cálcio (Al ₂ CaO ₄). Óxido de cálcio (CaO). Óxido de zircônia (O ₂ Zr). Óxido de ferro (Fe ₃ O ₄). Dióxido de silício (SiO ₂). Agente dispersante.
Mecanismo de ação	Hidratação dos silicatos de cálcio, formando gel C-S-H e liberação de íons de cálcio para a indução da formação de tecido mineralizado.	Liberação de íons de cálcio, indução da formação de tecido mineralizado e selamento biológico.
Características	Biocompatível, bioatível, alta plasticidade, liberação de íons de cálcio e possui selamento biológico.	Pronto para o uso, alta alcalinidade, elevada radiopacidade e reage com a com umidade presente nos tecidos.
Tempo de trabalho	Requer mistura com o líquido plastificante antes do uso.	Produto pronto para o uso, não necessita de mistura.
Tempo de presa	15 minutos	30 a 120 minutos dependendo da umidade local.

2.3 PERFURAÇÕES RADICULARES E SEU TRATAMENTO

As perfurações radiculares são complicações odontológicas que podem ocorrer por questões patológicas ou acidentalmente durante procedimentos odontológicos, como tratamento endodôntico, cirúrgicos ou traumáticos, resultando em comunicações entre o espaço pulpar e tecido periodontal circundante ou estruturas anatômicas adjacentes, como seios maxilares ou forames mandibulares (Tsesis *et al.*, 2010; Saed *et al.*, 2016). As perfurações radiculares podem ocorrer por uma série de fatores iatrogênicos, tais como uso inadequado de instrumentos endodônticos,

principalmente em anatomias complexas e fraturas ou trincas radiculares pré-existentes (Tsesis *et al.*, 2006). As perfurações também podem acontecer como consequências de evolução da cárie dentária ou de reabsorção radicular interna e/ou externa (Roda, 2001).

As perfurações oriundas de fatores iatrogênicos podem ocorrer em diferentes regiões das raízes dentárias e sua localização pode influenciar o tratamento e o prognóstico do dente afetado (Lopes, 1999). As perfurações podem acontecer na câmara pulpar (perfuração de furca ou perfuração lateral) (Estrela *et al.*, 2018), ou no canal radicular (nos terços cervical, médio ou apical) (Roda, 2001; Silveira *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2016; Drukteinis *et al.*, 2019).

Independente da causa e da localização, é essencial que a perfuração seja identificada e tratada de forma adequada e precoce para preservar a saúde e a função do elemento dental (Estrela *et al.*, 2009). O diagnóstico de uma perfuração radicular é baseado na história clínica do paciente, exame físico e radiografias para uma melhor avaliação da extensão da lesão (Fuss, 1996). Uma perfuração não tratada, além de causar danos irreparáveis ao tecido duro do dente, causa um processo inflamatório na região e promove a desestruturação dos tecidos ao redor do dente afetado (Tsesis *et al.*, 2006). As perfurações na região de furca e no terço médio da raiz têm efeitos mais prejudiciais no prognóstico do tratamento endodôntico. Isso ocorre devido à promoção de uma resposta inflamatória na região periodontal, que pode levar a perda de suporte dentário e, em alguns casos, até mesmo à perda do dente. Dependendo do grau de reabsorção da crista óssea causada pela perfuração, pode-se formar uma bolsa periodontal (Touré *et al.*, 2011). A destruição do osso alveolar pode resultar na formação de tecido de granulação, que pode invaginar para o dente seguindo o trajeto da perfuração. Além disso, a estimulação dos restos epiteliais de Malassez pode levar à formação de um cisto (Holland *et al.*, 2001). A ausência de tratamento adequado da perfuração permite que fluídos se infiltrem na cavidade pulpar, o que favorece o crescimento de microrganismos responsáveis pela indução e manutenção da inflamação (Tsesis *et al.*, 2006).

O tratamento das perfurações radiculares pode variar de acordo com seu tamanho, localização e o tempo decorrido desde o momento da perfuração (Oswald, 1979). Em geral, existem duas abordagens principais para o tratamento dessas lesões. A primeira é uma intervenção não cirúrgica que consiste no reparo imediato durante o procedimento e a segunda é uma intervenção cirúrgica (Roda, 2001). O

reparo imediato durante o procedimento é realizado quando a perfuração é identificada no momento em que ocorre e o cirurgião-dentista pode realizar o reparo imediato da lesão. A primeira conduta a ser feita são tomadas radiográficas ou outros meios de imagem para determinar a localização, tamanho e extensão da perfuração. Em seguida, se houver sangramento na área perfurada, é importante controlá-lo antes de prosseguir com o reparo. Isso pode ser feito por meio de compressas hemostáticas ou outros métodos adequados (Frank, 1973).

A limpeza da área perfurada é outra etapa importante para que seja removido quaisquer detritos ou contaminantes que possam estar presentes na região afetada. Existem várias soluções irrigantes que são frequentemente recomendadas para a desinfecção de perfurações radiculares durante o tratamento endodôntico (Ruksakiet *et al.*, 2020). Essas soluções têm propriedades antimicrobianas que ajudam a eliminar microrganismos e resíduos do local da perfuração. Alguns exemplos de soluções irrigantes mais recomendadas pela literatura incluem o hipoclorito de sódio, clorexidina, peróxido de hidrogênio, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido cítrico, QMix, mistura de um isômero de tetraciclina, ácido cítrico e detergente (MTAD) e dentre outras. O hipoclorito de sódio é a solução que apresenta ser a mais próxima do ideal por ter a capacidade de dissolver tecidos e componentes orgânicos (Matthias, 2006). Essa solução é recomendada em casos de perfurações internas, coronárias, cervicais, apicais e em raízes acessórias. Entretanto, apesar de seu uso ser eficaz para a descontaminação, deve ser usado com cuidado especialmente em concentrações mais altas, pois pode causar irritação dos tecidos periapicais se extravasar do canal radicular (Haapasalo *et al.*, 2014). A clorexidina na forma líquida ou em gel a 2% podem ser utilizadas em casos de perfuração radicular muito extensa para auxiliar na desinfecção como em casos de perfurações coronárias, cervicais, internas e apicais (Gomes *et al.*, 2013). É importante observar que a clorexidina pode ter um efeito mais residual do que o hipoclorito de sódio e, portanto, pode ter um impacto nas propriedades mecânicas do material a ser utilizado posteriormente na região perfurada (Loxley *et al.*, 2003). Portanto, seu uso deve ser seguido de irrigação com soro ou água destilada. A escolha da solução irrigante, seja hipoclorito de sódio, clorexidina ou outra opção, dependerá da situação clínica específica e da abordagem mais adequada para a desinfecção da perfuração radicular em questão. Geralmente, o hipoclorito de sódio a 2,5% é uma opção confiável para a desinfecção em vários casos de perfuração radicular, porém cada caso irá determinar a melhor solução

irrigante a ser utilizada (Matthias, 2006). Além disso, a escolha do material e a técnica de reparo são essenciais para garantir um excelente vedamento (Ruddle, 2002). Por fim, a confirmação do reparo da região deve ser verificada por meio de radiografias para que o dentista tenha segurança de que o defeito foi corrigido adequadamente. As tomografias computadorizadas também representam exame complementar necessário para avaliação correta da perfuração radicular (Tsesis *et al.*, 2010).

O tratamento imediato das perfurações radiculares aumenta as chances de sucesso do tratamento endodôntico e permite uma melhor recuperação dos tecidos circundantes (Asgary, 2008). Entretanto, nem todas as perfurações radiculares podem ser reparadas imediatamente. Em alguns casos mais complexos, pode ser necessário o planejamento de um procedimento adicional cirúrgico para corrigir a perfuração em um momento posterior (Roda, 2001). Desta forma, existem algumas situações em que o tratamento cirúrgico pode ser mais apropriado como em perfuração extensa, com contaminação e inflamação. Esse tratamento permite que o dentista avalie completamente a extensão do dano, tome medidas para reduzir a inflamação e a contaminação, e planeje adequadamente o reparo da perfuração em um momento mais apropriado (Regan *et al.*, 2005). É importante ressaltar que esse tipo de tratamento não deve ser procrastinado indefinidamente.

Historicamente, diversos materiais foram utilizados para o reparo de perfurações, como amálgama, óxido de zinco e eugenol, super EBA (óxido de zinco e eugenol reforçado), guta-percha, material restaurador intermediário (IRM), hidróxido de cálcio, resina composta e ionômero de vidro (Jhonson, 1999). Entretanto, nenhum desses materiais foram capazes de estabelecer um ambiente propício para a restauração da estrutura dentária e uma cicatrização previsível após o tratamento. A falta de eficiência desses materiais pode ser atribuída à sua incapacidade de vedar a comunicação entre a cavidade oral e os tecidos circundantes, bem como à sua ausência de biocompatibilidade (Al-Daafas, 2007). Frente as limitações apresentadas por esses materiais, o uso dos cimentos a base de MTA e dos biocerâmicos de reparo surgiram como alternativa em várias circunstâncias, incluindo o vedamento de perfurações, sobretudo devido à sua capacidade de promover a formação de tecido mineralizado, capacidade de vedação e compatibilidade com o organismo (Torabinejad *et al.*, 2010).

Lee *et al.* (1993) compararam o MTA com o super EBA e IRM para o reparo de perfurações radiculares laterais e concluíram que o MTA apresentou menores índices

de infiltração marginal. Na sequência, diversos estudos apontam a superioridade do MTA em relação aos materiais que foram inicialmente sugeridos para o reparo das perfurações (Holland *et al.*, 2001; Bortoluzzi *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2009; Mohammadi *et al.*, 2011). Dessa forma, uma abordagem inovadora surgiu para o selamento de perfurações radiculares em procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos. As análises iniciais do MTA demonstraram que ele apresentava um bom desempenho ao selar perfurações devido à sua capacidade induzir processos de mineralização (Torabnejad *et al.*, 1993; Duarte *et al.*, 2009). A capacidade de vedação dos cimentos biocerâmicos é alcançada por meio de sua interação com a dentina, que leva à formação de uma zona intermediária mineralizada. Essas estruturas se estendem para os túbulos dentinários, funcionando como uma âncora micromecânica, proporcionando uma vedação eficaz das perfurações radiculares (Atmeh *et al.*, 2012).

A atividade das células de fibroblastos humanos, osteoblastos e células da polpa dental humana quando em contato com o MTA já foi amplamente documentada na literatura e inúmeras pesquisas realizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que investigaram a relação entre células, tecidos e este biomaterial, comprovaram a sua capacidade de biocompatibilidade (Torabinejad *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2019; Martínez-Cortés *et al.*, 2017). O MTA, em suas diferentes formulações, tem sido amplamente estudado quanto à sua biocompatibilidade e aplicabilidade em procedimentos endodônticos. O MTA *Repair HP* (Angelus) é das variações do MTA e pode ser considerado uma evolução do material original, uma vez que ele pertence a segunda geração dos biocerâmicos de reparo. Porém, ambos são conhecidos por sua capacidade de interagir favoravelmente com os tecidos periapicais e promover a regeneração tecidual (Abrão *et al.*, 2023). A biocompatibilidade e a bioatividade são uma das suas principais características e em relação à sua biocompatibilidade com as células do ligamento periodontal em casos de perfuração radicular, estudos científicos e evidências clínicas demonstram que este material é bem tolerado por essas células e tende a promover uma resposta favorável (Benetti *et al.*, 2019). Ele tem a capacidade de estimular a formação de tecido mineralizado e de permitir a formação de um selamento biocompatível entre tecidos radiculares e o ligamento periodontal. Isso é especialmente benéfico em casos de perfurações radiculares, onde a integração dos tecidos é essencial para o sucesso do tratamento (Parirokh *et al.*, 2010). Além disso, eles têm sido associados à indução da diferenciação de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal em células osteoblásticas,

contribuindo para a formação de tecido mineralizado e regeneração tecidual. O MTA e o MTA *Repair HP* (Angelus) são considerados biocompatíveis por ter baixa toxicidade para as células do ligamento periodontal. Isso é importante para minimizar qualquer efeito adverso nas células durante o processo de regeneração além de estar ligado a redução da resposta inflamatória no ligamento periodontal, ajudando a criar um ambiente propício para a cicatrização da área afetada (Ferreira *et al.*, 2019). Outra variação do MTA é o biocerâmico Bio C *Repair* (Angelus), representado pela terceira geração dos biocerâmicos, que também apresenta excelentes características de biocompatibilidade celular. Diversos estudos indicam que a adição do óxido de zircônio ao material além de ser capaz de induzir a proliferação celular e assim aumentar as taxas de biocompatibilidade entre células e tecido, minimizando a resposta inflamatória e promovendo a regeneração do ligamento periodontal e contribuindo para a cicatrização tecidual, ele também confere a radiopacidade deste material (Abrão *et al.*, 2023).

Independente da abordagem utilizada e do material de escolha, é fundamental que o profissional realize um planejamento cuidadoso e individualizado para cada caso. É importante destacar que o tratamento adequado das perfurações radiculares é crucial para evitar complicações futuras, como infecções, abscessos e perda do dente afetado. Além disso, o acompanhamento adequado do paciente é essencial para verificar a eficácia do tratamento. Sendo assim, o sucesso do tratamento depende do diagnóstico precoce e da escolha adequada da técnica de reparo, garantindo assim a preservação do elemento dentário que sofreu tal injúria.

2.4 CIRURGIA PARENDODÔNTICA E SEU TRATAMENTO

Apesar do alto índice de sucesso ao longo do tempo nas taxas do tratamento endodôntico convencional, a persistência de condições periapicais não saudáveis não é incomum (Del Fabbro *et al.*, 2016). As lesões periapicais se formam devido a uma resposta inflamatória causada por infecções ou traumas no interior do sistema de canais radiculares, geralmente envolvendo reabsorção óssea e presença de granulomas ou pode apresentar-se como uma área cística semissólida e liquefeita (D. Ricucci *et al.*, 2015). O sistema imunológico do indivíduo é capaz de reparar essas lesões após realização de tratamento endodôntico (Shekhar *et al.*, 2013). No entanto,

em alguns casos é necessária uma intervenção cirúrgica, representada pela cirurgia parendodôntica (Kohli *et al.*, 2018; Safi *et al.*, 2019; Sutter *et al.*, 2020).

A cirurgia parendodôntica é indicada em casos de insucesso na terapia endodôntica convencional, sendo uma alternativa para evitar extrações (Travassos *et al.*, 2020). A cirurgia parendodôntica é fundamentada em dois propósitos distintos, o primeiro foca na eliminação do fator etiológico, enquanto o segundo tem como meta prevenir a reintrodução de agentes infecciosos aos tecidos periodontais após a remoção do agente causal (Cohen *et al.*, 2011; Sutter *et al.*, 2020). Além disso, possui como objetivo o vedamento de todos os pontos de saída e istmos, e a criação de um ambiente propício à regeneração dos tecidos perirradiculares (Göran *et al.*, 1998). As principais indicações para a realização dessa cirurgia são lesão na área apical do dente, quando há perfurações muito extensas de raízes no terço médio ou apical, raízes muito longas, fraturas de instrumentos endodônticos e raízes dilaceradas (Torabinejad *et al.*, 2009). Porém, existem alguns casos em que a cirurgia está contraindicada por questões anatômicas, complicações médicas ou sistêmicas (Bellizi *et al.*, 1991).

Uma das modalidades cirúrgicas, é a apicectomia, seguida de retroobturação. Esta modalidade envolve a remoção da porção apical da raiz de um dente, juntamente com o tecido infectado ou inflamado ao seu redor, seguido da confecção de uma retrocavidade e selamento com biomaterial (Zafar *et al.*, 2020). O protocolo terapêutico para o tratamento consiste na avaliação por meio de exames clínicos e radiográficos para avaliar a condição do dente, identificar a presença de infecção ou lesão no ápice da raiz do dente e determinar se a apicectomia é realmente necessária (Toubes *et al.*, 2019). Em situações mais desafiadoras, especialmente quando se trata de molares superiores e inferiores, a utilização de imagens tridimensionais não só simplifica o processo de tomada de decisão para determinar a viabilidade da intervenção, mas também permite o planejamento preciso da cirurgia. Isso inclui a avaliação da extensão da lesão, a localização dos ápices radiculares em relação às estruturas ósseas vestibular e palatina, o canal mandibular, a cavidade maxilar e outros fatores relevantes (Baumann *et al.*, 2010).

O acesso cirúrgico é realizado por meio de uma pequena incisão na gengiva próxima ao dente afetado, após a incisão é realizado o deslocamento e o afastamento do retalho e em seguida realiza-se a osteotomia para expor a área apical da raiz. Com acesso à área apical, a ponta da raiz do dente é cuidadosamente removida. Isso é

realizado para eliminar qualquer tecido infectado ou inflamado que possa estar causando a infecção persistente (Loes *et al.*, 2010). A curetagem e a limpeza da área são realizadas após a remoção do ápice da raiz do dente e confecção da retrocavidade, a limpeza e a desinfecção da área afetada têm o objetivo de baixar a carga microbiana. Assim, a descontaminação deve ser realizada na cripta óssea e sobre a superfície radicular exposta (Gomes *et al.*, 2013). Alguns antimicrobianos já foram propostos para esta descontaminação, como a irrigação radicular com digluconato de clorexidina à 2%, a tetraciclina (Kohli *et al.*, 2018; Seedat *et al.*, 2018) e a terapia fotodinâmica (Trindade *et al.*, 2017). O laser infravermelho de baixa potência utilizado na terapia fotodinâmica é capaz de induzir a liberação de radicais livre que resultam em um efeito bactericida e assim melhora a eficiência da desinfecção (Souza *et al.*, 2019). Por fim, a área é selada com um material de reparo que seja biocompatível.

Assim como o tratamento endodôntico convencional pode enfrentar resultados desfavoráveis, a cirurgia parendodôntica também está sujeita a eventuais falhas. A maioria das falhas em procedimentos cirúrgicos pode ser atribuída à escolha dos materiais empregados (Bun *et al.*, 2005). Dado que a seleção do material é frequentemente determinante para o êxito da cirurgia parendodôntica, nos últimos anos, diversas alternativas de materiais têm sido propostas para otimizar o sucesso do tratamento (Torabinejad, M *et al.*, 2010).

Atualmente, os biocerâmicos de reparo são os materiais preferidos para as cirurgias parendodônticas devido às suas propriedades biocompatíveis, que minimizam as reações adversas nos pacientes, e à capacidade de selar efetivamente as áreas tratadas, impedindo vazamentos e infecções (Torabinejad *et al.*, 2010). Além disso, eles também são radiopacos, o que ajuda no monitoramento do processo pós-cirúrgico (Bonte *et al.*, 2015). O biomaterial MTA é composto por elementos como silicato tricálcio, óxido tricálcio e aluminato de tricálcio (Parirokh, 2010). Quando entra em contato direto com tecidos humanos, o MTA pode desencadear uma série de efeitos, como estimular a proliferação celular por meio dos íons de óxido de cálcio (Fridland, 2003), criar um ambiente antibacteriano devido a sua natureza alcalina (Tanomaru-Filho *et al.*, 2007), regular a produção de citocinas (Huang *et al.*, 2005) e o equilíbrio entre os sistemas imunológicos Th1 e Th2 (Rezende *et al.*, 2008), promover a diferenciação e migração de tecidos duros (Kuratate *et al.*, 2008) e,

adicionalmente, atuar na formação de um vedamento biológico (Bozeman *et al.*, 2006).

Os biocerâmicos de reparo mais comumente utilizados em apicectomias incluem o MTA (Angelus), ProRoot (Dentsply/), BioRoot RCS (Septodont), MTA *Repair HP* (Angelus) e o Bio C *Repair* (Angelus) (Zhou *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2019; Abrão *et al.*, 2023). Em uma série de experimentos envolvendo diferentes métodos de aplicação, o MTA (Angelus) demonstrou uma notável capacidade de selamento, além de promover a formação de tecido ósseo resistente e estimular o processo de cementogênese (Zhou *et al.*, 2017). Esses biocerâmicos são aplicados na retrocavidade (Baumann *et al.*, 2010). O reparo pós-tratamento cirúrgico vai depender de cada caso, estando diretamente relacionadas a capacidade de descontaminação, remoção do agente causal, capacidade de vedamento e biocompatibilidade do cimento de reparo utilizado (Zafar *et al.*, 2020).

2.5 BIOATIVIDADE DOS BIOCERÂMICOS DE REPARO

A bioatividade dos biocerâmicos endodônticos de reparo está diretamente relacionada à sua capacidade de vedar os canais radiculares, estimular a formação de tecido mineralizado e promover a cicatrização. A bioatividade nesse contexto refere-se à capacidade desses materiais de interagir com os tecidos periapicais e promover a cicatrização e regeneração dos tecidos danificados (Song *et al.*, 2021). Essas características fazem com que estes biocerâmicos sejam uma opção valiosa para garantir o sucesso dos procedimentos endodônticos (Jitaru *et al.*, 2016).

Alguns aspectos relacionados a bioatividade dos biocerâmicos endodônticos de reparo se destacam como capacidade de induzir a formação de hidroxiapatita na interface com os tecidos periapicais (Mahmoud *et al.*, 1999). A formação de hidroxiapatita promove a mineralização e ajuda na selagem dos canais radiculares, ajudando a prevenir na infiltração bacteriana e na entrada de materiais irritantes nos tecidos periapicais, reduzindo assim o risco de infecções e promovendo a cicatrização. Eles também estimulam a diferenciação e a proliferação de células envolvidas na regeneração tecidual, como células-tronco e células do ligamento periodontal, promovendo um excelente prognóstico após o tratamento (Tomás-Catalá *et al.*, 2017). Além disso, relatos na literatura demonstram que este biomaterial não apresenta contração durante a presa, mas tendem a ter uma contração mínima durante o

processo de endurecimento, o que ajuda evitar lacunas e infiltrações indesejadas (Ehsani *et al.*, 2014). Apesar de não ser uma característica marcante, alguns biocerâmicos de reparo podem exibir propriedades antibacterianas, ajudando a manter um ambiente livre de bactérias (Cheng *et al.*, 2010).

A bioatividade dos biocerâmicos se manifesta principalmente por meio de suas interações com os tecidos adjacentes. Os biocerâmicos influenciam na proliferação, diferenciação, migração e apoptose de células-tronco, osteoclastos e osteoblastos, células da polpa dentária, células do ligamento periodontal e células do sistema imunológico (Tomás-Catalá *et al.*, 2017). A reação das células à presença deste biomaterial desempenha um papel fundamental no resultado do processo de cicatrização e regeneração dos tecidos (Song *et al.*, 2021). Em especial, o tecido periodontal desempenha um papel crucial na restauração dos tecidos ao redor dos dentes, uma vez que abriga uma variedade de células (Mu *et al.*, 2017). Essas células possuem a capacidade de se renovar por conta própria e possui potencial de se diferenciar em vários tipos celulares, o que as tornam candidatas viáveis para impulsionar o processo de regeneração óssea (Byoung-Moo *et al.*, 2004).

Diversos estudos publicados em revisões sistemáticas demonstraram elevada bioatividade dos cimentos endodônticos de reparo MTA ProRoot (Dentsply) e Biodentine (Septodont), além de outras características, como biocompatibilidade, capacidade de selamento, adesão, solubilidade e eficácia microbiana (Escobar-García *et al.*, 2016; Parirokh *et al.*, 2017). Estudos prévios realizados por Jung *et al.* (2014) e Tang *et al.* (2019) revelaram que o Biodentine (Septodont) exibe uma excelente biocompatibilidade com as células do ligamento periodontal que é comparável a resposta obtida na presença do MTA. Esses achados relacionados ao Biodentine (Septodont) estão em conformidade com pesquisas anteriores nas quais testes de MTT revelaram padrões de proliferação celular e toxicidade semelhantes em diversas linhagens celulares (Attik *et al.*, 2014; Abuarqoub *et al.*, 2020). Em um outro estudo realizado por Abuarqoub *et al.* (2020), a concentração de 2mg/mL de Biodentine (Septodont) foi identificada como a mais favorável em termos de biocompatibilidade para facilitar a migração, aderência e mineralização das células-tronco do ligamento periodontal humano (hPDLCs). Notadamente, concentrações mais baixas de Biodentine (Septodont), como 2, 0,20 e 0,02 mg/mL, demonstraram aumentar significativamente a sobrevivência das hPDLCs, ao passo que concentrações mais elevadas, como 20 mg/mL, exibiram toxicidade celular,

possivelmente devido ao aumento do pH. Segundo Hakki *et al.* (2012) o pH elevado do Biodentine (Septodont) leva a um aumento nos níveis de íons de ferro e cálcio no ambiente extracelular. A toxicidade observada nos estudos de Abuarqoub *et al.* (2020) com concentrações mais elevadas (20 mg/mL) do Biodentine (Septodont) na viabilidade das hPDLCs pode ser atribuída a um desequilíbrio nos níveis de íons, resultando um efeito tóxico sobre as células.

Seguindo a mesma proposta Collado-González *et al.* (2019) avaliaram os efeitos do MTA *Repair HP* (Angelus) e do ProRoot MTA (Dentsply) nas hPDLCs após serem submetidos a condições neutras e ácidas. Cada material foi exposto, durante um período de 7 dias, a solução salina tamponada com fosfato com pH = 7.4 e ácido butírico com pH = 5.2. Os resultados indicaram que a exposição a um ambiente ácido causou a liberação de íons de silício e cálcio tanto do MTA *Repair HP* (Angelus) e do ProRoot MTA (Dentsply). Além disso, em ambos os ambientes, os dois biocerâmicos testados exibiram propriedades biológicas satisfatórias em relação à sobrevivência das células, morte celular e aderência celular. Esses resultados estão em consonância com os resultados de uma pesquisa anterior, que observou liberação de quantidades mais significativas de cálcio em um ambiente com pH 5.4 em comparação ao ambiente com pH 7.4 na presença do ProRoot MTA (Dentsply) (Tian *et al.*, 2017).

Os níveis mais altos de íons de silício e cálcio podem estimular a diferenciação e a proliferação de células-tronco mesenquimais na região periapical, que podem promover a diferenciação de osteoblastos e cementoblastos, ao mesmo tempo em que impedem o desenvolvimento de osteoclastos. Isso oferece suporte aos processos de cicatrização ao redor das raízes dentárias (Zamparini *et al.*, 2018). Os cementoblastos são células especializadas que estão envolvidas na formação do cimento e a liberação dos íons de silício, cálcio e fosfato são essenciais para a mineralização do cimento (Hakki *et al.*, 2013). Além disso, a liberação desses íons pode contribuir para a mineralização e formação óssea durante o processo de cicatrização da parte óssea circundante, estimulando a regeneração e reparação dos tecidos periapicais e resolvendo defeitos ósseos (Zhou *et al.*, 2014). Jimenez-Sanchez *et al.* (2019) realizaram um estudo *in vitro* sobre a análise de bioatividade do biomaterial MTA *Repair HP* (Angelus) em contato com fluido corporal simulado (SBF) por 4, 24, 72 e 168 horas. Os resultados indicaram que após o período de 72 horas de exposição ao SBF, o material foi capaz de induzir a formação de uma camada estruturada de revestimento composta por fosfato de cálcio cristalizado. Essa resposta

bioativa deste material pode estar atribuída à abundância de aluminato de cálcio presente em sua composição (Taddei *et al.*, 2014). O SBF é uma solução que imita as características dos fluidos presentes no corpo humano. Sua composição é ajustada para imitar as concentrações de íons, pH e outros componentes que estão presentes em fluidos corporais reais (Buerlein 2007). O uso do SBF em pesquisas *in vitro* com os biocerâmicos endodônticos proporciona uma abordagem eficaz para avaliar a biocompatibilidade, a resposta fisiológica e os processos de biomineralização desses materiais em um ambiente simulado que reflete as condições reais do corpo humano (Moraes *et al.*, 2022).

Mais recente, um estudo *in vitro* realizado com os materiais MTA (Angelus), Biodentine (Septodont) e Bio C *Repair* (Angelus) em contato com células Saos-2 demonstraram, por meio dos ensaios de MTT e vermelho neutro (NR), que a viabilidade do MTA (Angelus) e do Biodentine (Septodont) foram semelhantes. No entanto, a viabilidade celular na presença do Bio C *Repair* (Angelus) apresentou-se diminuída em relação ao MTA (Angelus) e ao Biodentine (Septodont) (Campi *et al.*, 2023), fato que pode estar associada às disparidades na forma como esses materiais são apresentados (Benetti *et al.*, 2019). É possível que uma parte dos materiais prontos para o uso, como no caso do Bio C *Repair* (Angelus), não tenha sido adequadamente hidratada, resultando em uma maior liberação de substâncias no meio de cultura (Beth *et al.*, 2011).

Esses materiais possuem em sua composição várias substâncias, incluindo silicato de cálcio, fosfato de cálcio e óxido de zircônio (Zhekov *et al.*, 2021). A liberação desses elementos para o organismo pode ocorrer em pequenas quantidades ao longo do tempo devido à degradação ou dissolução dos biocerâmicos. No entanto, a liberação desses elementos geralmente é considerada segura em níveis muito baixos (Abrão *et al.*, 2023). Além disso, muitos estudos têm avaliado a segurança e eficácia desses biomateriais e não encontraram evidências significativas de toxicidade (Escobar-García *et al.*, 2016; Raghavendra *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2023).

Diante disso, é importante ressaltar que a bioatividade dos biocerâmicos pode variar dependendo da composição química, da estrutura porosa e das propriedades superficiais de cada material. Portanto, a seleção do biocerâmico adequado para uma aplicação clínica requer considerações cuidadosas em relação às propriedades do material e às necessidades do tratamento.

Diante da crescente importância dos biocerâmicos no contexto endodôntico, este projeto vem a fornecer dados relacionados os biocerâmicos de reparo com fabricação nacional, MTA *Repair HP* (Angelus) e Bio C *Repair* (Angelus). Estes biomateriais têm demonstrado propriedades notáveis, como biocompatibilidade, capacidade de selamento hermético, e potencial para promover a regeneração tecidual. Contudo, apesar dos avanços significativos, há lacunas substanciais na literatura que motivam esta pesquisa. A compreensão abrangente dos mecanismos celulares subjacentes à interação entre o material e os tecidos periapicais e a atividade antimicrobiana ainda não foi totalmente elucidada na literatura. A identificação desse processo é crucial para otimizar a eficácia dos materiais e aprimorar as técnicas de aplicação. Dessa forma, este projeto visa maior compreensão da interação biológica dos cimentos de reparo e a presença de microrganismos, além da resposta de células do ligamento periodontal em diferentes situações simuladas *in vitro*, na presença destes materiais. Espera-se que essa pesquisa contribua significativamente para a evolução do conhecimento nesta área e que forneça subsídios importantes para aprimorar a eficácia e a confiabilidade desses materiais no tratamento endodôntico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antimicrobiana, citotóxica, proliferativa, migratória e resposta imune dos extratos dos cimentos de reparo MTA *Repair HP* e Bio C *Repair*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de inibição do crescimento de *E. faecalis* e *C. albicans* na presença dos extratos dos cimentos MTA *Repair HP* e Bio C *Repair*.
- Avaliar a viabilidade celular das culturas do hPDLCs, por meio do ensaio de MTT, na presença dos extratos dos cimentos MTA *Repair HP* e Bio C *Repair*.
- Avaliar os efeitos dos extratos dos cimentos MTA *Repair HP* e Bio C *Repair* na proliferação e migração das células do hPDLCs.
- Avaliar a expressão gênica de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* e *IL-10* por qPCR nas culturas de células hPDLCs após exposição aos extratos de MTA *Repair HP* e Bio C *Repair*

4. MÉTODOS

4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Este projeto de pesquisa foi realizado em dois espaços da Universidade Católica de Brasília (UCB): na unidade de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia e nas clínicas dos estágios supervisionados em Odontologia, do curso de Odontologia da UCB. A etapa de coleta dos elementos dentários aconteceu na clínica de estágio supervisionado em Taguatinga, enquanto toda a sequência da pesquisa foi conduzida no laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia. O Curso de Odontologia da UCB oferece aos estudantes uma infraestrutura específica moderna e de qualidade. Já a Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia apresenta uma estrutura de excelência no Centro-Oeste, na área de bioquímica e biologia molecular, contando com a estrutura básica para o desenvolvimento do projeto como a estrutura inicial para o isolamento de peptídeos como HPLCs, espectros de massa (LC/ESI/MS/MS e LC/MALDI/TOF/MS), coletores, centrífugas, equipamentos para géis de eletroforese e géis bidimensionais. Além disso, este grupo conta com estrutura para sequenciamento de DNA de alto desempenho, inúmeras máquinas de PCR, fluxos laminares e shakes para crescimento de bactérias e leveduras. Apresenta uma sala de cultivo celular, de uso restrito, com fluxo laminar, estufa de CO₂, microscópio invertido e todo material de consumo para realização de cultivo celular. Possui salas adequadas para o manejo de células, bactérias, fungos e dentre outros microrganismos. Os equipamentos todos de última geração que atendem as demandas provenientes da reformulação das linhas de pesquisa do programa e nos gera maior confiabilidade dos resultados científicos. Desta forma, toda a estrutura necessária para realização do projeto é apresentada pela UCB.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A primeira etapa do projeto aconteceu na clínica integrada de Odontologia da UCB, localizada em Taguatinga, campus 1 (Brasília - DF), onde foi realizada a coleta dos dentes. A coleta dos dentes foi realizada após a autorização do Comitê de Ética e Pesquisa (CAAE: 61252922.7.0000.0029) (Anexo A). O paciente foi abordado antes

de começar o procedimento cirúrgico. Teve uma prévia apresentação para a identificação de ambos e assim foi explicado que o aluno de mestrado precisava da doação dos terceiros molares para poder desenvolver um projeto de pesquisa que envolve o trabalho com as células do ligamento periodontal do dente. Foi perguntado se o paciente tem interesse de ficar com os dentes que serão extraídos ou se eles poderiam ser doados para colaborar com a pesquisa científica. Após a autorização, foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) onde o paciente leu atentamente e em caso de dúvidas foi conversado e no final foi pedido que o paciente assinasse o termo, pois, o dente é um órgão e como todo órgão doado foi necessária uma assinatura do doador constatando a autorização da doação do elemento dentário. Ao final da cirurgia o dente foi recolhido e colocado em um frasco contendo uma solução meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM - Gibco, Grand Island, NY, EUA) com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Gibco) e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco) que teve a capacidade de nutrir e preservar as células do dente, durante o transporte para o laboratório. Esse frasco foi armazenado em uma caixa de isopor contendo gelo, para manter uma temperatura estável e as células não sofrerem tanto estresse com os deslocamentos. Após a coleta dos dentes, a caixa de isopor contendo os frascos com os dentes foi levada para o laboratório de Biotecnologia da UCB, localizado em Taguatinga no campus 1, bloco G (Brasília – DF). Neste laboratório, foram extraídas as células do ligamento periodontal destes dentes e iniciou-se a expansão da cultura destas células. Toda esta parte experimental foi realizada na sala de cultivo celular. Esta sala era composta por duas grandes estufas adequadas para o manejo com células, materiais essenciais, totalmente fechada sem janelas e com ar-condicionado para ajudar na circulação do ar. Todos os preceitos éticos foram obedecidos em todas as fases do projeto.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no projeto, pacientes de ambos os sexos, encaminhados para exodontia de terceiros molares hígidos, inclusos, semi-inclusos ou erupcionados doados de pacientes com idade superior a 18 anos e inferior a 30 anos. Possíveis indicações para o procedimento de extração dental incluem: dentes em desenvolvimento com risco de impaction ou impactados, pacientes com

pericoronarite, presença de reabsorção óssea local ou das raízes dos segundos molares, cistos odontogênicos e apinhamentos.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos da pesquisa pacientes com idade inferior a 18 anos e superior a 40 anos, dentes com cárie dentária, pacientes com doença periodontal e casos que não houve assinatura do TCLE.

4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

Bio C *Repair* (Angelus) é um cimento reparador pronto para uso e foi preparado em placas de cultura de 24 poços com aproximadamente 0,04 g de massa em 4 poços e foi coberto com gaze úmida e mantido por aproximadamente 120 min em incubadora contendo 5% de CO₂, a 37 °C. O cimento MTA *Repair HP* (Angelus) foi manuseado seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, o MTA *Repair HP* (Angelus) pesando 0,085g foi dividido em quatro partes iguais de 0,02125g e a massa foi inserida em 4 poços de uma placa de 24 poços e incubada a 37 °C, por 15 min. Após cada tempo de presa dos cimentos, o meio utilizado foi o meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Cultilab, Campinas, SP, Brasil), meio *Mueller Hinton Broth* (MHB) (Sigma Chemicals Co., St Louis, EUA) ou meio RPMI 1640 (Sigma Chemicals Co., St Louis, EUA) suplementado com MOPS (0.165 mol.L⁻¹), dependendo do experimento a ser realizado, incubado a 37 °C por 24h, de acordo com a Organização Internacional de Padronização (ISO) 10993-5. Após 24h de incubação, o meio exposto ao cimento de reparo foi coletado e filtrado com filtros estéreis de 0,22 mm. Após a filtragem dos extratos, o cimento foi dividido em 3 grupos: extrato não diluído (1:1) e extrato diluído (1:2 e 1:4). Os extratos foram preparados um dia antes de cada experimento e filtrados no dia do experimento.

A análise dos extratos dos cimentos foi realizada por espectrometria de massas utilizando a técnica de dessorção/ionização a laser assistida por matriz com analisador de tempo de voo (MALDI-ToF/MS). Utilizou-se como matriz uma solução de ácido alfa-ciano-4 hidroxicinâmico (10 mg.mL⁻¹) em 50% de acetonitrila, 49,7% (v:v) de água ultrapura e 0,3% (v:v) de ácido trifluoracético. A matriz foi misturada às amostras na proporção de 1:3 e então esta mistura foi aplicada em uma placa de MALDI (MTP

AnchorChip 400/384 target plate, Bruker Daltonics) até sua cristalização em temperatura ambiente. Os espectros foram adquiridos em modo refletido positivo, com razão massa/carga na faixa de 20 a 1000 m/z utilizando o *software Flexcontrol 3.0*. O equipamento foi calibrado utilizando a própria matriz como calibrador externo. Também foi realizado um espectro de varredura nas amostras utilizando um Espectrofotômetro Genesys 50 (Thermo Fisher Scientific) na faixa UV/VIS 190 a 1000 nm. Além disso, com o objetivo de eliminar um possível viés de diluição, uma amostra de cada cimento foi preparada e diluída logo em seguida, sem deixar que os cimentos tomassem presa (*Fresh*). Este preparo e os extratos dos cimentos pós presa foram submetidos tanto à espectrometria de massas quanto a varredura em UV/VIS.

4.6 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE MTA *REPAIR HP* E *BIO REPAIR* CONTRA *E. FAECALIS* E *C. ALBICANS*

Primeiramente, os valores de pH dos extratos foram analisados 24h após o preparo. Em seguida, a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo protocolo de ensaio de inibição do crescimento por microdiluição em caldo, conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com adaptações (CLSI, 2003). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas para *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A inibição de *C. albicans* foi realizada em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com MOPS ($0,165 \text{ mol.L}^{-1}$), utilizando uma concentração de inicial de $2,5 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ por poço na fase log. Placas contendo *C. albicans* (ATCC 10231) tratadas com extratos dos cimentos foram incubadas por 48h a 30 °C, sob agitação média. Os bioensaios de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram testados em meio *Mueller Hinton Broth* (Sigma) na concentração de $5 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ na fase log. Placas contendo *E. faecalis* (ATCC 29212) tratadas com extratos dos cimentos foram incubadas por 24h a 37 °C, sob agitação média. Todas as concentrações testadas foram inoculadas em placas de Petri com meio ágar *Luria Bertani* (LB) (Sigma Chemicals Co., St Louis, EUA) (24h, a 37 °C) para *E. faecalis* (ATCC 29212) e meio ágar *Sabouraud* (Kasvi, R. Brasholanda, 240 - Weissópolis, Pinhais - PR) (48h, a 37 °C) para *C. albicans* (ATCC 10231) para determinar a capacidade bactericida/fungicida (MBC/MFC). O número de UFC em cada grupo foi comparado com o controle (não tratado) para determinar o MBC e o MFC. Nos casos em que a concentração mínima necessária para inibir o crescimento microbiano não

foi alcançada, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento, utilizando o controle positivo como valor de referência para 100% de inibição.

4.7 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO

Este projeto foi autorizado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Católica de Brasília (UCB), sob número CAAE: 61252922.7.0000.0029. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a utilização do elemento dente extraído para pesquisa científica. As células do ligamento periodontal foram avaliadas após raspagem radicular com curetas dos dentes extraídos. Em seguida, o tecido foi cultivado em meio de cultura DMEM (Gibco, EUA) com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Gibco), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco) e 20% de soro bovino fetal (FBS) (Cultilab). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade até atingir a confluência necessária para a realização dos experimentos. O meio de cultura foi trocado a cada três dias (Al-Habib *et al.*, 2019; Kajiya *et al.*, 2010).

4.8 VIABILIDADE DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DO MTA *REPAIR HP* E DO BIO *C REPAIR*

Células do ligamento periodontal humano (1×10^4 células por poço) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (TPP, EUA) por 24h em meio DMEM suplementado (Gibco) com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Gibco), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco) e 20% de soro bovino fetal (FBS) (Cultilab). Em seguida, as células foram estimuladas com extratos de MTA *Repair HP* (Angelus) e Bio *C Repair* (Angelus) (1:1, 1:2 e 1:4) e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade por mais 24h. Após a incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazólio) e a absorbância foi realizada em leitor ELISA (570 nm) (Loosdrecht *et al.*, 1991).

4.9 MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DO MTA *REPAIR HP* E DO BIO C *REPAIR*

A avaliação da migração celular foi realizada pelo método *scratch* (He *et al.*, 2022). Neste ensaio, hPDLCs ($2,5 \times 10^5$ células por poço) foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (Prolab) em meio DMEM suplementado (Gibco) com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Gibco), $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco) e 20% de soro bovino fetal (FBS) (Cultilab) mantidos em estufa por 24h a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de umidade, até formar uma monocamada confluenta. Em seguida, uma ferida artificial foi reproduzida nas superfícies dos poços com uma ponta de micropipeta plástica de $1000 \mu\text{L}$. As células restantes foram lavadas e novo meio DMEM suplementado (Gibco) sem soro fetal bovino foi adicionado juntamente com extratos do cimento de reparo. As culturas foram incubadas e monitoradas por até 48h. Fotografias utilizando microscópio foram tiradas nos tempos 0, 24 e 48h. As imagens foram processadas e as células localizadas na região da ferida foram contadas utilizando o *software Image J* (NIH, Bethesda, MD). O potencial proliferativo das hPDLCs foi realizado utilizando uma técnica de exclusão *Trypan Blue* (Tomás *et al.*, 2020). hPDLCs (1×10^4 células) foram incubadas com extratos MTA *Repair HP* (Angelus) e Bio C *Repair* (Angelus) (1:1, 1:2 e 1:4) por 24 e 48h. Posteriormente, as células foram ressuspensas e uma solução de corante *Trypan Blue* a 0,4% (Sigma) foi adicionada durante 1 minuto. O número de células foi imediatamente contado e comparado com o número de células inicial.

4.10 EXPRESSÃO GÊNICA INFLAMATÓRIA E ANTI-INFLAMATÓRIA POR CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DO MTA *REPAIR HP* E DO BIO C *REPAIR*

A expressão de marcadores inflamatórios e antiinflamatórios por hPDLCs incubados com extratos dos cimentos reparadores foi avaliada pelo método qPCR em tempo real. Para realizar diferentes condições de cultivo *in vitro*, lipopolissacarídeo (LPS $-1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*, Sigma), interferon-gama (IFN- γ $-1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sigma) e a combinação de ambos por 24h foram utilizados como estímulos adicionais. Todos os cimentos de reparo foram avaliados nessas condições.

Após o cultivo celular, o RNA foi extraído pelo método TRIzol™ (ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA) (Xu *et al.*, 2021). Em seguida, a quantificação do RNA foi determinada utilizando *NanoDrop One* (ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA). O RNA total foi revertido - transcrito usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, EUA) e a PCR quantitativa foi realizada usando *SYBR™ Green Universal Master Mix* (Applied Biosystem, EUA). Os genes avaliados foram *GAPDH*, *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6* e *IL-10* (Tabela 2). As reações foram realizadas em duplicatas técnicas utilizando o sistema *QuantStudio 1 Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, EUA) e a expressão relativa foi obtida pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001). Os valores médios de Ct foram obtidos de amostras usando hPDLCs de controle ou LPS-hPDLCs ou LPS-IFN γ -hPDLCs como referência.

Tabela 2- Sequência de primers para cada gene usado no ensaio de PCR

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')
<i>TNF-α</i>	DIRETO	5'-CACAGTGAAGTGCTGGCAAC-3'
	REVERSO	5'-GATCAAAGCTGTAGGCCCCA-3'
<i>IL-1β</i>	DIRETO	5'-GCACTACAGGCTCCGAGATGAA-3'
	REVERSO	5'-GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT-3'
<i>IL-6</i>	DIRETO	5'-CCCACCAGGAACGAAAGTCA-3'
	REVERSO	5'-GGCAACTGGCTGGAAGTCTCT-3'
<i>IL-10</i>	DIRETO	5'-TAAGGGTTACTTGGGTTGCCA-3'
	REVERSO	5'-TCTGGGCCATGGTTCTCTG-3'
<i>GAPDH</i>	DIRETO	5'-AGTGGCAAAGTGGAGATT-3'
	REVERSO	5'-GTGGAGTCATACTGGAACA-3'

4.11 ANÁLISES ESTADÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. De acordo com a análise estatística, a distribuição normal foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram submetidos ao cálculo da média e desvio padrão (DP) para cada experimento. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* Graph Pad Prism 8 (Califórnia, EUA). As diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA unidirecional e pós-teste de Tukey, com significância de $p < 0,05$.

5. CAPÍTULO 1: MANUSCRIPT

Artigo preparado para ser submetido na revista: *International Endodontic Journal* (IF: 5.4, A1 CAPES).

MTA REPAIR HP AND BIO C REPAIR: ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL, CYTOTOXIC, MIGRATION AND CYTOKINE EXPRESSION

ABSTRACT

Aim: Endodontic treatment seeks to reduce microorganisms from the root canals and prevent reinfections, however due to the anatomical complexity of root canal systems, complications such as perforations or failure in endodontic treatment can occur, requiring surgical interventions in some cases. In this context, bioceramic repair sealers stand out as promising alternatives due to their bioactivity and biocompatibility, favoring tissue regeneration and ensuring better results in endodontic repairs and apical sealing. Therefore, this study aimed to evaluate the antimicrobial potential of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) and its toxicity, proliferative, migratory and immunomodulatory effects on primary cultures of human periodontal ligament cells (hPDLCs). **Methodology:** Initially, extracts of repair sealers were prepared in different dilutions (1:1, 1:2 and 1:4). The antimicrobial activity of repair sealer extracts was tested by evaluating its minimum inhibitory concentration for *E. faecalis* (ATCC 29212) and *C. albicans* (ATCC10231) growth. Subsequently, the cytotoxicity of the repair sealer extracts was verified in hPDLCs culture using the MTT colorimetric assay. Then, the analysis of proliferative effect and migration was evaluated in hPDLCs culture by Trypan Blue exclusion technique and scratch assay, respectively. Finally, the effect of repair sealers on gene expression was evaluated by qPCR, of pro-inflammatory cytokines' *tumor necrosis factors (TNF- α)*, *interleukin (IL)-1 β* , and *IL-6* and the regulatory cytokine *IL-10*, in different experimental situations. **Results:** Results demonstrated that Bio C Repair (Angelus) sealer extract (1:1) and its dilution (1:2) showed 46.56% and 9% inhibition of *E. faecalis* (ATCC 29212) growth, respectively, while the MTA Repair HP (Angelus) extract did not detect any antimicrobial activity against these tested microorganisms. No tested dilution of either material was toxic to hPDLCs, allowing a minimum viability of 99.65%. In addition, both

repair sealer extracts led to greater cell proliferation and migration in their dilutions (1:2 and 1:4) compared to the control, after 48h. They also down-regulated the expression of pro-inflammatory cytokines (*IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α*) and maintained the expression of the immunomodulatory cytokine *IL-10*, under inflammatory conditions. **Conclusion:** Therefore, Bio C Repair (Angelus) showed limited antimicrobial activity, while both sealers demonstrated biocompatibility, and promoted cell proliferation and migration. Additionally, they modulated the inflammatory response, supporting their potential for endodontic repairs and apical sealing.

Keywords: bioceramics, repair sealer, antimicrobial activity, biocompatibility, bioactivity.

INTRODUCTION

Endodontic treatment aims to eliminate microorganisms present in the root canal system, as well as prevent their reinfection. However, endodontic failure is a reality that affects a significant portion of patients, resulting in cases of retreatment or even the need for more invasive surgical interventions, such as endodontic surgery (Travassos *et al.*, 2020). One of the main factors that contribute to the failure of endodontic treatment is the presence of root perforations, which can occur during canal instrumentation or as a result of pathological resorptions (Estrela *et al.*, 2018). These perforations, when inadequately managed, may result in tooth loss due to their potential to establish a direct pathway between the root canal system and the periapical tissues. This communication facilitates the infiltration of microorganisms, thereby compromising the integrity of the affected tooth and exacerbating the inflammatory response in the surrounding tissues (Tsesis *et al.*, 2006).

In this context, the development of bioceramic repair sealers has emerged as a promising solution for the treatment of root perforations and other endodontic challenges (Torabinejad *et al.*, 2016). These materials have bioactive properties that favor the regeneration of periapical tissues, in addition to presenting biocompatibility characteristics that make them ideal for use in root repair and apical sealing procedures (Zafar *et al.*, 2020).

MTA Repair HP (Angelus, Londrina, Brazil) is an evolution of traditional MTA sealer, known for its versatility and effectiveness in a variety of endodontic procedures,

as it is the second generation of bioceramics. The High Plasticity (HP) version was developed to improve the handling and flow properties of the material, which facilitates its insertion in difficult-to-access areas, such as root perforations and bone defects (Palczewska-Komsa *et al.*, 2021). Furthermore, MTA Repair HP (Angelus) maintains the bioactive properties of the original MTA, such as the ability to induce the formation of hard tissue (cementum, bone or dentin), contributing to the sealing of perforations and the regeneration of adjacent tissues (Song *et al.*, 2021).

Building upon the advancements seen in MTA-based materials, Bio C Repair (Angelus, Londrina, Brazil), in turn, is a more recent bioceramic repair sealer, formulated with a combination of calcium silicate and zirconium oxide, which aims to optimize its biocompatibility and bioactivity (Toubes *et al.*, 2021). This material stands out for its ability to release calcium ions, which play a fundamental role in inducing the mineralization of periapical tissues and promoting bone repair (Zhekov *et al.*, 2021). Furthermore, Bio C Repair (Angelus) has antimicrobial percentages that help control infection at the site of the injury, a critical factor for the success of the treatment (Dong *et al.*, 2023).

It has been demonstrated that this repair sealer inhibits *E. faecalis*, likely due to its ion release, which also promotes tissue repair. In contrast, MTA Repair HP (Angelus), although not exhibiting antimicrobial potential, stands out for its excellent biocompatibility, supporting cell viability, migration, and the regeneration of mineralized tissues, making it highly suitable for bone repair in apical and lateral defects. Although there are studies on the antimicrobial activity, cell viability, migration and immune response of periodontal ligament cells in the presence of repair sealers, much of the evidence focuses on MTA Repair HP (Angelus). For Bio C Repair (Angelus), however, data remains more limited, especially under the tested conditions. This underscores the importance of further research to fully elucidate the biological responses of both materials. These gaps in understanding its behavior and potential applications motivated the design of this study.

The bioactive properties of bioceramic sealers are essential for their success in clinical applications. By enabling effective tissue repair, these materials not only increase the chances of clinical success, but also open new perspectives for safer and more effective treatments in endodontics, benefiting both professionals and patients. Therefore, this study aims to evaluate the antimicrobial activity, cytotoxicity and ability

of these materials to induce cell proliferation and migration, in addition to analyzing immunological responses in human periodontal ligament cells.

MATERIALS AND METHODS

MTA Repair HP and BIO C Repair extract preparation

Bio C Repair (Angelus) is a ready-to-use repair sealer. It was prepared in a 24-well culture plates with approximately 0.04 g of mass in 4 wells and was covered with damp gauze and kept for approximately 120 min in an incubator containing 5% CO₂, at 37 °C. MTA Repair HP (Angelus) sealer was handled following instructions from the manufacturer. Then, MTA Repair HP (Angelus) weighing 0.085g was divided into four equal parts of 0.02125g and the mass was inserted into 4 wells of a 24-well plate and incubated at 37 °C, for 15 min. After each sealer's set time, the medium used was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS - Cultilab, Campinas, SP, Brazil), Mueller Hinton Broth medium (MHB - Sigma Chemicals Co., St Louis, USA) or RPMI 1640 medium (Sigma Chemicals Co., St Louis, USA) supplemented with MOPS (0.165 mol.L⁻¹), depending on the experiment to be carried out, incubated at 37 °C for 24h, in accordance with the International Organization for Standardization (ISO) 10993-5. After 24h incubation, the medium exposed to repair sealer was collected and filtered with 0.22 mm sterile filters. After filtering the extracts, the sealer was divided into 3 groups: undiluted extract (1:1) and diluted extracts (1:2 and 1:4). Extracts were prepared one day before each experiment and filtered on the day of the experiment.

Characterization of MTA Repair HP and BIO C Repair extracts

To eliminate a potential dilution bias, preparation of each repair sealer was made and diluted immediately thereafter, without allowing it to solidify (Fresh). This preparation and the extracts were subjected to both mass spectrometry and UV/VIS scanning. Sealers repair extracts were analyzed by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-ToF/MS). A solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg.mL⁻¹) in 50% acetonitrile, 49.7% (v:v) ultrapure water, and 0.3% (v:v) trifluoroacetic acid was used as the matrix. The matrix was mixed

with the samples in a 1:3 ratio, and this mixture was then applied to a MALDI target (MTP AnchorChip 400/384, Bruker Daltonics) and allowed to crystallize at room temperature. Mass spectra were acquired using a 20 to 1000 m/z range, positive reflected method, on AutoFlex Speed device (Bruker Daltonics, Germany) using Flexcontrol 3.0 software. The instrument was calibrated using the matrix as an external calibrant. A scanning spectrum was also performed on the samples using a Genesys 50 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) in the UV/VIS range of 190 to 1000 nm onto a quartz cuvette. To eliminate a possible dilution pathway, preparation of each sealer was made and diluted immediately afterwards, without allowing it to solidify (Fresh). This preparation and the extracts were subjected to both mass spectrometry and UV/VIS scanning.

Antimicrobial evaluation of MTA Repair HP and BIO C Repair against *E. faecalis* and *C. albicans*

First, the pH values of the extracts were analyzed 24 hours after preparation. Then, antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution growth inhibition assay protocol, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute, with adaptations (CLSI, 2003). Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined for *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). *C. albicans* inhibition was performed in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with MOPS (0.165 mol.L⁻¹), using an input concentration of 2.5x10³ CFU.mL⁻¹ per well at log phase. Plates containing *C. albicans* (ATCC 10231) treated with sealer extracts were incubated for 48h at 30 °C, under medium agitation. *E. faecalis* (ATCC 29212) bioassays were tested in Mueller Hinton Broth medium (Sigma) at a concentration of 5x10⁵ CFU.mL⁻¹ at log phase. Plates containing *E. faecalis* (ATCC 29212) treated with sealer extracts were incubated for 24h at 37 °C, under medium agitation. All tested concentrations were inoculated into Petri dishes with Luria Bertani medium (LB - Sigma Chemicals Co., St Louis, USA) (24h, at 37 °C) for *E. faecalis* (ATCC 29212) and Sabouraud medium (Kasvi, R. Brasholanda, 240 - Weissópolis, Pinhais - PR) (48h, at 37 °C) for *C. albicans* (ATCC 10231) to determine minimum bactericidal/fungicide concentrations (MBC/MFC). The number of CFUs in each group was compared with the control (untreated) to determine the MBC and MFC. In cases where the minimum concentration required to inhibit microbial growth was not achieved, the percentage of

growth inhibition was calculated, using the positive control as the reference value for 100% inhibition.

Primary culture of human periodontal ligament cells

This project was authorized by the human research ethics committee of the Catholic University of Brasília (CAAE: 61252922.7.0000.0029). All patients signed a consent form providing free and informed consent, authorizing the use of the element tooth extracted for scientific research. Human periodontal ligament cells (hPDLCs) were assessed after root scaling with curettes of the extracted teeth. Then, tissue was cultured in DMEM medium (Gibco) supplemented with 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of penicillin (Gibco), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of streptomycin (Gibco), and 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Cultilab). Plates were incubated in an oven at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity until reaching the concentration necessary to carry out the experiments. Culture medium was changed every three days (Al-Habib *et al.*, 2019; Kajiya *et al.*, 2010).

Human periodontal ligament cell viability after exposure to MTA Repair HP and BIO C Repair extracts

hPDLCs (1×10^4 cells per well) were cultured on 96-well culture plates (TPP, USA) for 24h in DMEM medium (Gibco) supplemented with 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of penicillin (Gibco), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of streptomycin (Gibco), and 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Cultilab). Then, cells were stimulated with extracts of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) (1:1, 1:2 and 1:4) and incubated at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity for more than 24h. After incubation, cell viability was assessed by MTT colorimetric assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and absorbance was performed on an ELISA reader (570 nm) (Loosdrecht *et al.*, 1991).

Human periodontal ligament cell migration and proliferation after exposure to MTA Repair HP and BIO C Repair extracts

Cell migration assessment was performed using the scratch method (He *et al.*, 2022). In this assay, hPDLCs (2.5×10^5 cells per well) were seeded in 6-well culture plates (Prolab) in DMEM medium (Gibco) supplemented with 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of penicillin

(Gibco), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of streptomycin (Gibco), and 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Cultilab) kept in an oven for 24h at 37 °C with 5% CO₂, until a confluent monolayer formed. Next, an artificial wound was reproduced on the well surfaces with a 1000 μL plastic micropipette tip. The remaining cells were washed and new supplemented DMEM medium (Gibco) without fetal bovine serum was added, along with repair sealer extracts. Cultures were incubated and monitored for up to 48h. Photographs using a microscope were taken at 0, 24 and 48h. Images were processed, and cells located in the wound region were counted using Image J Software (NIH, Bethesda, MD, USA). The proliferative potential of hPDLCs was performed using a Trypan Blue exclusion technique (Tomás *et al.*, 2020). hPDLCs (1×10^4 cells) were incubated with MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) extracts (1:1, 1:2 and 1:4) for 24 and 48h. Subsequently, cells were resuspended, and a 0.4% Trypan Blue dye solution (Sigma) was added for 1 minute. The number of cells was immediately counted and compared with the initial cell number.

Inflammatory and anti-inflammatory gene expression by human periodontal ligament cells after exposure to MTA Repair HP and BIO C Repair extracts

The expression of inflammatory and anti-inflammatory markers by hPDLCs incubated with repair sealer extracts was evaluated by real-time qPCR method. To perform differently *in vitro* culture conditions, lipopolysaccharide (LPS - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (*Escherichia coli* lipopolysaccharides, Sigma), interferon-gamma (IFN- γ - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Sigma) and the combination of both for 24h were used as additional stimuli. All repair sealers were evaluated under these conditions. After cell culture, RNA was extracted using the TRIzol™ method (ThermoFisher Scientific, California, USA) (Xu *et al.*, 2021). Then, RNA quantification was determined using NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, California, USA). Total RNA was reverse-transcribed using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) and quantitative PCR was performed using SYBR™ Green Universal Master Mix (Applied Biosystem, USA). The genes evaluated were *GAPDH*, *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-10* (Table 1). The reactions were performed in technical duplicates using QuantStudio 1 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, USA) and relative expressions were obtained by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak *et al.*, 2001). The mean Ct values were obtained from samples using control hPDLCs or LPS-hPDLCs or LPS-IFN γ -hPDLCs as a reference.

TABLE 1: Primer sequence for each gene used in the qPCR assay.

GENE	PRIMER	SEQUENCE (5'-3')
<i>TNF-α</i>	FORWARD	5'-CACAGTGAAGTGCTGGCAAC-3'
	REVERSE	5'-GATCAAAGCTGTAGGCCCCA-3'
<i>IL-1β</i>	FORWARD	5'-GCACTACAGGCTCCGAGATGAA-3'
	REVERSE	5'-GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT-3'
<i>IL-6</i>	FORWARD	5'-CCCACCAGGAACGAAAGTCA-3'
	REVERSE	5'-GGCAACTGGCTGGAAGTCTCT-3'
<i>IL-10</i>	FORWARD	5'-TAAGGGTTACTTGGGTTGCCA-3'
	REVERSE	5'-TCTGGGCCATGGTTCTCTG-3'
<i>GAPDH</i>	FORWARD	5'-AGTGGCAAAGTGGAGATT-3'
	REVERSE	5'-GTGGAGTCATACTGGAACA-3'

STATTICAL ANALYSES

All experiments were performed in technical and biological triplicates. According to statistical analysis, normal distribution was verified by the Shapiro-Wilk test, suitable for evaluating data normality. The results were subjected to calculation of the mean and standard deviation (SD) for each experiment. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software (California, USA). Statistical differences were verified by the one-way ANOVA test, appropriate for comparing means between groups, followed by Tukey's post-test to identify significant differences between groups, with significance established at $p < 0.05$.

RESULTS

Characterization of MTA Repair HP and BIO C Repair extracts

Although the matrix generated a background in this mass range (172.2, 190.2, 212.1, 235.2, 284.6, 335.4, 379.2, 401.4, 524.5 and 568.7 m/z), it was possible to observe different ions originating from the sample (39.3, 60.3, 88.3, 146.3, 664.6). Basically, the same ions were observed in both repair sealer extracts (Supplementary Figures 1 and 2). However, none of the observed ions were compatible with what was expected in terms of the sample components (Table 2 and 3). Furthermore, analysis in the scanning spectrophotometer revealed that the extracts of both repair sealer had

detectable components in the samples, but it was not possible to identify precisely what these elements were (Supplementary Figure 3). However, the accurate identification of the compounds present was limited due to the predominantly inorganic nature of the sealers since the technique is more suitable for the detection of biomolecules and high molecular weight organic compounds.

Table 2: MTA Repair HP Components

MTA Repair HP	Average Mass (g/mol)	Monoisotopic Mass (Da)
Tricalcium silicate	228.32	2.278.392.722
Dicalcium silicate	232.322	231.848.523
Tricalcium aluminate	270.19	269.820.337
Calcium oxide	60.084	599.667
Calcium tungstate	287.93	287.893.181

Table 3: Bio C Repair Components

Bio C Repair	Average Mass (g/mol)	Monoisotopic Mass (Da)
Calcium silicate mass	172.24	171. 8817
Calcium aluminate	158.038	157.905.327
Calcium oxide	60.084	599.667
Zirconium oxide	123.22	121.894.528
Iron oxide	231.53	231.784.465
Silicon dioxide	60.084	59.966.755.773
Dispersing agent	No information	No information

Antimicrobial evaluation of MTA Repair HP and BIO C Repair against *E. faecalis* and *C. albicans*

A pH check was performed which ranged from 7.48 to 9.49 for the MHB medium and 6.75 to 9.32 for the RPMI medium (Table 4). Then, bioceramics Bio C Repair (Angelus) and MTA Repair HP (Angelus) were analyzed for their inhibition activity against *E. faecalis* and *C. albicans* growth (MIC) and bactericidal (MBC) or fungicidal (MFC) effects. None of the tested repair sealers were able to inhibit 100% of the microbial growth of both microorganisms. It was observed that the undiluted extract and the diluted extract (1:2) of Bio C Repair (Angelus) inhibited 46.56% and 9% of *E. faecalis* growth, respectively. Furthermore, they did not present bactericidal activity (MBC) and antifungal activity (MIC and MFC) against *C. albicans*, at any tested dilution.

MTA Repair HP extract (Angelus) also did not demonstrate antibacterial (MIC and MBC) and antifungal (MIC and MFC) effects against *E. faecalis* and *C. albicans* in any tested dilution (Table 5).

TABLE 4: pH assessment of MTA Repair HP and Bio C Repair extracts.

TESTED MATERIAL	pH in MHB medium (24h)	pH in RPMI medium (48h)
Control	7.48	7.02
Bio C Repair (1:1)	9.49	7.35
Bio C Repair (1:2)	8.58	7.35
Bio C Repair (1:4)	8.02	7.03
MTA Repair HP (1:1)	8.83	9.32
MTA Repair HP (1:2)	8.42	7.12
MTA Repair HP (1:4)	7.81	6.75

TABLE 5: Antimicrobial activity carried out in technical and biological triplicates of Bio C Repair and MTA Repair HP sealers extract against *E. faecalis* and *C. albicans* *in vitro*. Positive control was represented by ampicillin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *E. faecalis* and amphotericin B 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, for *C. albicans*. Bactericidal and fungicidal tests are also represented. Undiluted (1:1) and diluted (1:2) Bio C Repair sealer extract showed a percentage of *E. faecalis* growth inhibition of 46,56% and 9%, respectively. ND: Not detected.

TESTED MATERIAL	MICROORGANISMS			
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	MIC	MBC	MIC	MFC
Bio C Repair (1:1)	ND (46,56%)	ND	ND	ND
Bio C Repair (1:2)	ND (9%)	ND	ND	ND
Bio C Repair (1:4)	ND	ND	ND	ND
MTA Repair HP (1:1)	ND	ND	ND	ND
MTA Repair HP (1:2)	ND	ND	ND	ND
MTA Repair HP (1:4)	ND	ND	ND	ND

Viability of human periodontal ligament cells after exposure to MTA Repair HP and BIO C Repair extracts

MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) were not toxic to hPDLCS. A minimum of 99.65% of cell viability was observed (Figure 1A and 1B) in all conditions.

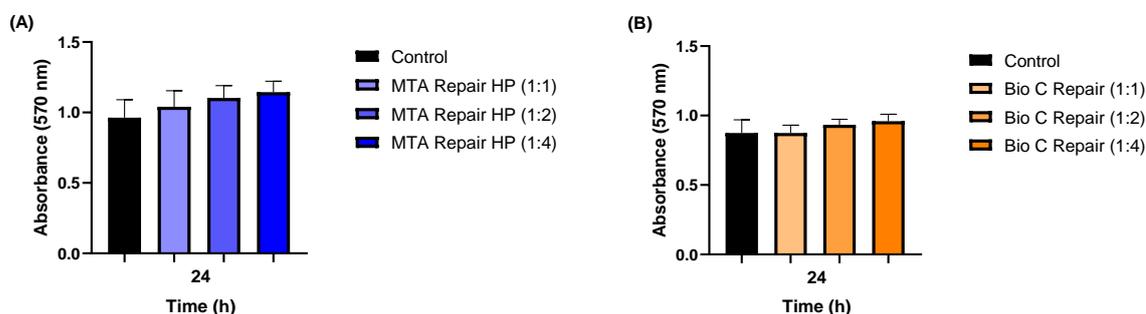


FIGURE 1: hPDLCs viability by MTT assay. hPDLCs viability after 24h of incubation with MTA Repair HP (A) and Bio C Repair (B) extracts (1:1, 1:2 and 1:4), after 24h. Graphs represent the mean and standard deviation of the absorbance of three biological replicates performed in technical triplicates. No statistical differences were found by ANOVA and Tukey post-test.

Human periodontal ligament cell migration and proliferation after exposure to MTA Repair HP and BIO C Repair extracts

It was noted that the more concentrated the biomaterial, the lower the cell migration. Noting that non-diluted extracts of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) extracts resulted in cell migration in a similar way to the control group (Figure 2A and 3A). Diluted MTA Repair HP (Angelus) extract (1:2 and 1:4) showed an increased number of migrated cells compared to the control group, after 24 and 48h ($p < 0.05$) (Figure 2A). Similar results were found in the presence of diluted Bio C Repair (Angelus) extract (1:2 and 1:4), which showed an increased number of migrated cells compared to the control group, after 24h ($p < 0.05$) (Figure 2A). Furthermore, a greater proliferation of hPDLCs was observed in the presence of both diluted extracts of repair sealers (1:2 and 1:4), when compared to the control group, after 24 and 48h ($p < 0.05$) (Figure 2B). Comparing undiluted extracts of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus), it was observed that both repair sealers promoted an increase in the number of migrated cells compared to the control group after 24 and 48h, but no statistically significant difference was found (Supplementary Figure 4A). Furthermore, undiluted extracts of Bio C Repair (Angelus) led to higher values of hPDLCs proliferation after 48h, when compared to control group ($p < 0.05$). On the other hand, undiluted MTA Repair HP (Angelus) extracts did not show a significant difference in relation to the control group in the same period (Supplementary Figure 4B).

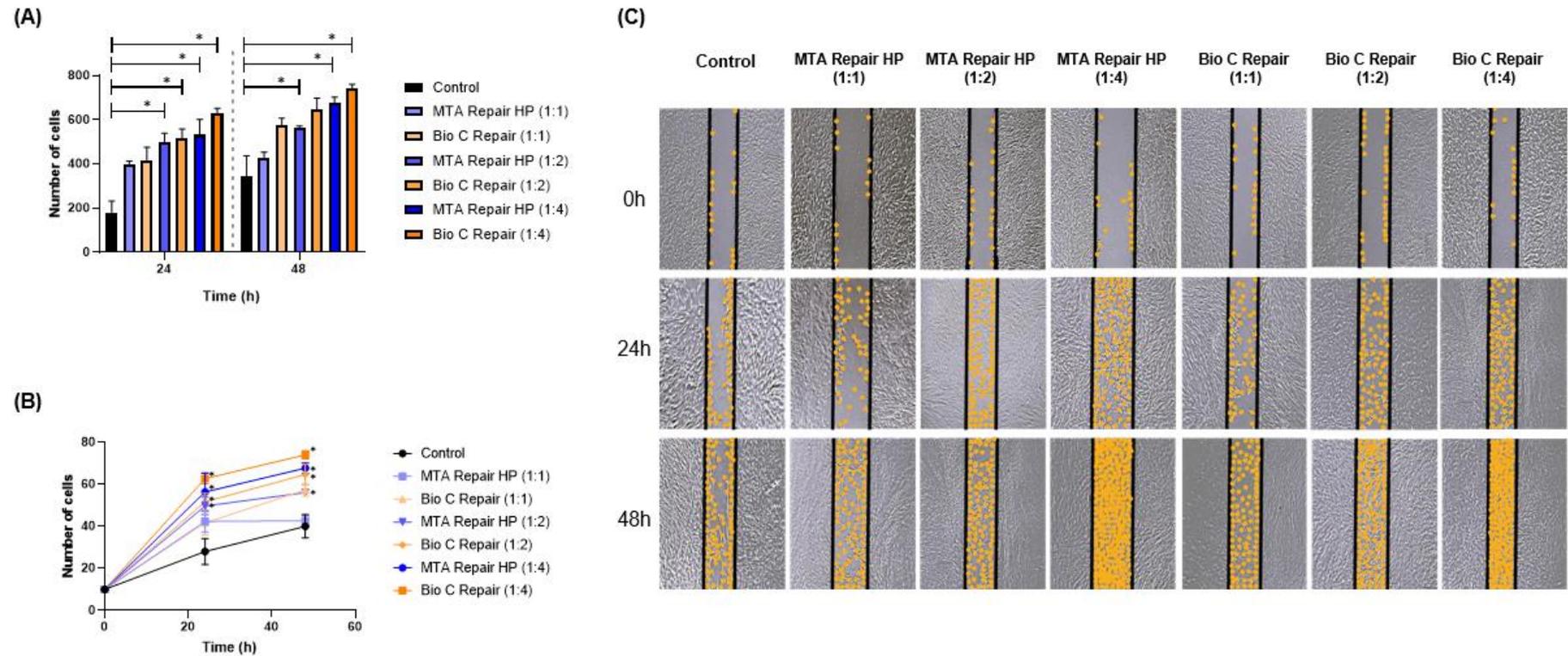


FIGURE 2: Cell migration and proliferation assays in hPDLCs. Cell migration was evaluated in contact with MTA Repair HP extract (1:1, 1:2 and 1:4), and Bio C Repair extract (1:1, 1:2 and 1:4) at 0h, 24h and 48h (A). Number of cells in contact with MTA Repair HP extract (1:2 and 1:4), and with Bio C Repair extract (1:2 and 1:4) that migrated to the wound. * $p < 0.05$ in 24h and 48h, respectively, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to control group. (B) Proliferation of hPDLCs using the trypan blue method after 24h and 48h in contact with MTA Repair HP extracts (1:1, 1:2 and 1:4), and Bio C Repair extract (1:1, 1:2 and 1:4). * $p < 0.05$ represents statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to control group after 24 and 48h. (C) Representative image of cell migration test. Dots indicate the presence of cells in the wound.

Effect of extracts from MTA Repair HP and BIO C Repair on cytokine gene expression by hPDLCs

TNF- α , *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-10* gene expression by hPDLC after exposure to tested sealers in different *in vitro* conditions (basal, LPS, and LPS plus IFN- γ) were evaluated (Figure 3). *TNF- α* was elevated in the presence of MTA Repair HP (Angelus) in basal conditions (Figure 3A, $p < 0.05$), but reduced in the presence of both bioceramics in LPS and LPS plus IFN- γ conditions (Figure 3B, $p < 0.05$; and C, $p < 0.05$). *IL-1 β* was down-regulated after exposure to MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus), when hPDLC were stimulated with LPS and LPS plus IFN- γ (Figure 3E, $p < 0.05$; and F; $p < 0.05$). *IL-6* expression was down-regulated in all tested conditions after exposure to MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) (Figure 3G, $p < 0.05$; H, $p < 0.05$; and I, $p < 0.05$). Finally, the *IL-10* expression was down-regulated in the presence of Bio C Repair (Angelus), under LPS plus IFN- γ condition (Figure 3L, $p < 0.05$).

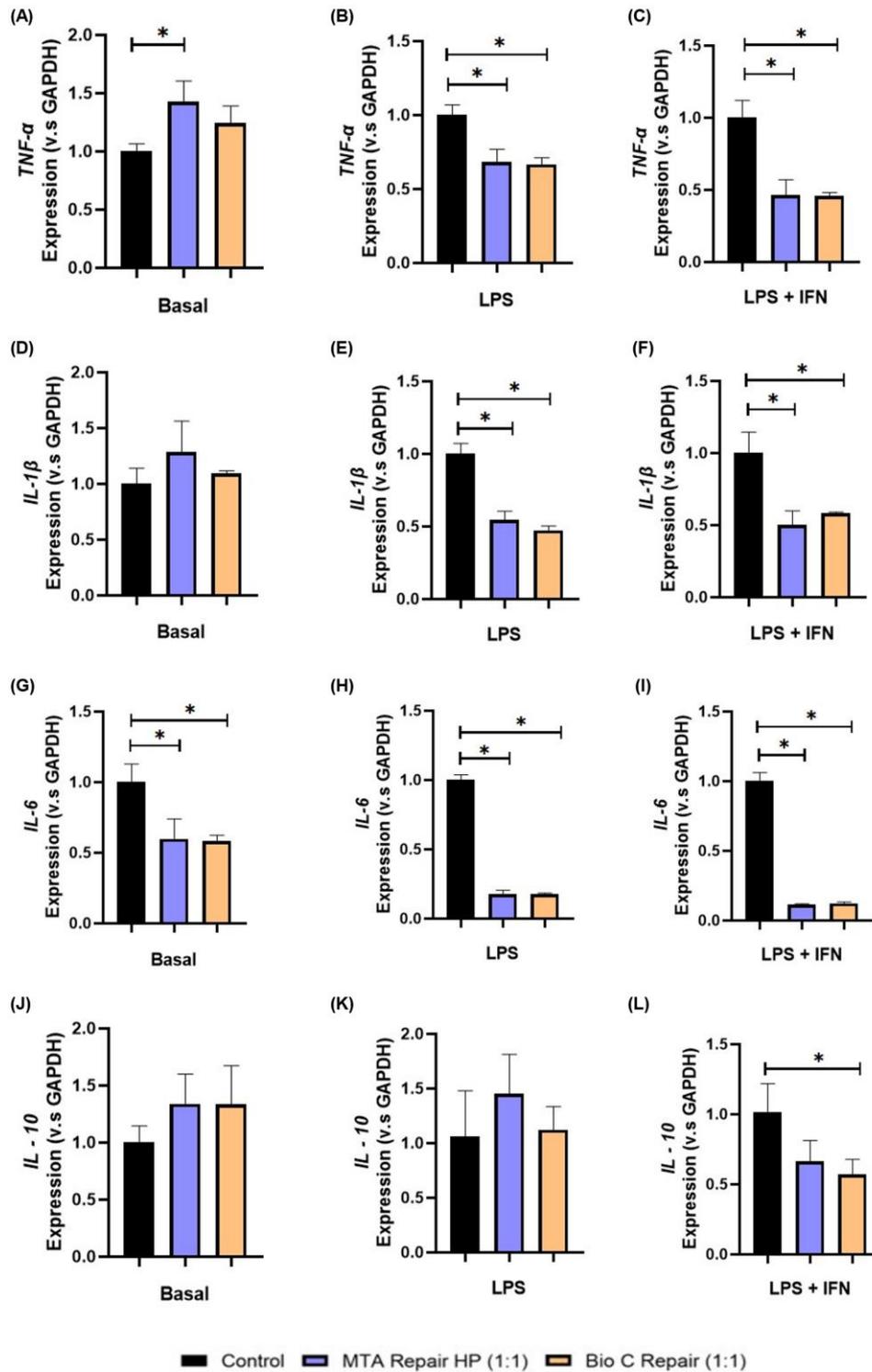


FIGURE 3: *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, and *IL-10* genes expression, by hPDL cells. Cells when exposed to MTA Repair HP (1:1), and Bio C Repair (1:1) in different conditions: basal (A, D, G and J), stimulated with LPS (B, E, H and K) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and LPS plus IFN- γ (C, F, I and L) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), after 24h of incubation. Graphs represent mean and standard deviation of three biological replicates in technical triplicate. * $p < 0.05$ represents statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to control group.

DISCUSSION

Modern endodontics constantly searches for materials that optimize the repair and regeneration process of dental tissues, especially in cases of periapical lesions and root perforations (Iandolo, 2022). The effectiveness of an endodontic material is often evaluated by its ability to hermetically seal root canals, by its biocompatibility and by its potential to promote tissue regeneration (Dawood *et al.*, 2017). Furthermore, antimicrobial capacity is a desirable characteristic, as the presence of pathogenic microorganisms, such as *E. faecalis* and *C. albicans*, is often associated with persistent infections and treatment failures (Lee *et al.*, 2022). Endodontic repair sealers, such as MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus), have emerged as promising options in the field of endodontics due to their biocompatible properties and possible antimicrobial potential.

MTA Repair HP (Angelus) is known for its calcium silicate, and it is widely recognized for its excellent sealing properties and biocompatibility, although its antimicrobial capabilities are less documented (Palczewska-Komsa *et al.*, 2021). Bio C Repair (Angelus) is also based on a calcium silicate-based composition, which promotes the release of ions that can be beneficial for bone regeneration and the healing of periodontal tissues (Toubes *et al.*, 2021). These properties are particularly relevant in the context of tissue repair, which depend on a delicate balance between the presence of pathogens and the inflammatory response, and essential cellular mechanisms, including migration, proliferation, differentiation of specialized cells, and the production and deposition of the mineralized tissue necessary for bone regeneration (da Rosa *et al.*, 2018). Recognizing the importance of all these events for effective repair, this study explored the antimicrobial activity, cell viability, cell proliferation and migration, and expression of cytokines in the presence of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) endodontic repair sealers.

Before evaluating these biological aspects, repair sealer extracts were analyzed using MALDI-ToF mass spectrometry to investigate their molecular composition. However, this technique presented limitations in the precise identification of the components present in the repair sealer extracts, since it is more suitable for the detection of biomolecules and high molecular weight organic compounds, with restrictions in the analysis of inorganic materials. This limitation highlights the need to use complementary techniques to adequately characterize the composition of the

materials studied. In this context, the study by Ghilotti *et al.* (2020) used energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) to analyze the elemental composition of the repair sealers. The results showed that Bio C Repair (Angelus) is composed mainly of carbon (34.81%) and oxygen (34.51%), while the calcium concentration (13.29%) was lower compared to ProRoot MTA (Dentsply), and Biodentine (Septodont). Furthermore, the material presented lower proportions of aluminum (0.79%), silicon (2.76%) and zirconium (13.83%). These differences in chemical composition can directly influence the physicochemical and biological properties of the cement, including its bioactivity and antimicrobial potential.

Considering that the chemical composition of an endodontic sealer is directly related to its biological properties, the presence and concentration of certain elements can affect its action against microorganisms. Microorganism control is crucial for the success of endodontic treatment. Therefore, it is desirable that the material used has antimicrobial properties, in addition to promoting the formation of mineralized tissue (Mente *et al.*, 2014). The results of this study revealed that only Bio C Repair (Angelus) showed antimicrobial activity, demonstrating a percentage of inhibition against the bacterium *E. faecalis* (ATCC 29212), while MTA Repair HP (Angelus) did not show the ability to inhibit the growth of *E. faecalis* (ATCC 29212) or *C. albicans* (ATCC 10231). These findings agree with some previous studies that indicate that Bio C Repair (Angelus) has specific bioactive components that confer its antimicrobial properties. It has been shown that Bio C Repair (Angelus) releases a higher amount of calcium and silicate ions compared to MTA Repair HP (Angelus) (Queiroz *et al.*, 2021). This fact may create an unfavorable environment for the survival of pathogenic microorganisms, which may explain the percentage of inhibition observed. The antimicrobial effect detected, especially in the 1:1 extract, suggests a concentration-dependent efficacy, which is corroborated by other studies that highlight the need for adequate concentrations to obtain robust antimicrobial effects (Abrão *et al.*, 2023). Furthermore, studies by Queiroz *et al.* (2021) also did not detect antimicrobial activity against *E. faecalis* and *C. albicans*, which further reinforce the results observed in this study. On the other hand, the lack of antimicrobial activity of MTA Repair HP (Angelus) against *E. faecalis* (ATCC 29212) and *C. albicans* (ATCC 10231) in this study is also supported by some reports in the literature, which indicate that MTA Repair HP (Angelus), despite its excellent sealing properties and biocompatibility, may not be sufficient on its own to eliminate certain resistant endodontic pathogens (Silva *et al.*, 2023). Some authors

suggest that combining MTA with additional antimicrobial agents, such as chlorhexidine or antibiotics, may be necessary to improve its effectiveness against a broader spectrum of microorganisms (Bidar *et al.*, 2015). Previous studies suggest that endodontic materials, including bioceramics, may present variability in their ability to inhibit the growth of different microorganisms, depending on several factors, such as chemical composition, porosity, and ion release capacity (Queiroz *et al.*, 2021). Furthermore, the intrinsic resistance of *C. albicans* to certain antimicrobial agents is well documented in the literature. The ability of this fungus to form biofilms resistant to antimicrobial treatments is an additional concern, as biofilms offer protection against antimicrobial agents and make eradication of the microorganism difficult (Wang *et al.*, 2018). This fact reinforces the need for rigorous prior disinfection before its use, to minimize the presence of microorganisms and optimize therapeutic results.

It is important to emphasize that the low antimicrobial activity observed by MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) does not invalidate their therapeutic potential in endodontic procedures. Current literature reinforces the need for a multifaceted product, where the combination of antimicrobial and biocompatible properties must be carefully balanced to optimize clinical results. Therefore, to evaluate the toxicity of both repair sealers, hPDLCs were exposed to undiluted and diluted extracts (1:1, 1:2 and 1:4). Results demonstrated no toxicity to hPDLCs in all tested dilutions after 24h, leading to a minimum viability of 95%. These results agree with the results found by Ferreira *et al.* (2019), who indicated similar viability rates of primary human osteoblast cells in contact with extracts of MTA Repair HP (Angelus) in different dilutions (1:1, 1:2 and 1:4). Furthermore, other studies have also found results similar to those found in this study, with human fibroblast cells maintaining guidelines in contact with MTA Repair HP (Angelus) extracts at concentrations of 100%, 50% and 25% (Chakar *et al.*, 2017). Chen *et al.* (2016) also tested MTA Repair HP (Angelus) extracts at different dilutions (1:1, 1:2, 1:4 and 1:8) exposed to human periodontal ligament fibroblasts, for 24h, 72h and 168h and were able to conclude that the more diluted the extracts (1:4 and 1:8), the greater the cell viability. The non-toxic effect of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) on hPDLCs can be attributed to the chemical composition of these bioceramics, which includes compounds such as calcium oxide, calcium silicate, and other elements that mimic the mineral composition of natural dental tissue (Ghilotti *et al.*, 2020). These components can interact favorably

with hPDLCs, promoting their adhesion, migration, and proliferation (Lopez-Garcia *et al.*, 2019).

Then, the next step was to evaluate the ability of these materials to promote hPDLC proliferation and migration over a period. Results indicated that both repair sealers were able to promote cell proliferation and regeneration in all tested dilutions. Notably, higher dilutions of the repair sealer led to greater cell migration and proliferation compared to the control. This fact is crucial to validate the efficacy of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) endodontic repair sealers in contact with hPDLCs, ensuring that they are safe and beneficial for clinical use. Several studies have demonstrated that these materials have bioactive properties that promote cell proliferation and migration. Delfino *et al.* (2021) carried out a study comparing liver tissue regeneration in an experimental rat model and concluded that both MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) had the ability to promote tissue regeneration. Furthermore, another study also evaluated extracts of MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) in different concentrations (1:1, 1:5, 1:10 and 1:15) in contact with Saos-2 cells, observing complete cell migration after 48h at a concentration of 1:10 (Campi *et al.*, 2023).

During the repair process, in addition to the absence of toxicity and the promotion of cell neoformation, another essential aspect is the regulation of the immune response. In this sense, the analysis of *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, and *IL-10* gene expression complement previous results. Thus, in this study, different *in vitro* conditions were designed to mimic different inflammatory scenarios relevant to endodontic infections. These conditions included the use of LPS, a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria used to simulate bacterial infection and strongly induce an inflammatory response by activating toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathways (Akira *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2016). Additionally, IFN- γ , a key cytokine involved in the immune response, was used in combination with LPS to represent a more complex and exacerbated inflammatory condition, as occurs in persistent or chronic infections (Dinarello *et al.*, 2000). This approach allows for a better understanding of how endodontic repair sealers interact with host immune mechanisms in both moderate and severe inflammatory environments, providing insights into their potential role in modulating tissue repair and immune responses.

Cytokines are important mediators of immune response activation and modulation (Cui *et al.*, 2024). Considering this importance, the modulation of their

expression by repair sealers can directly impact the tissue repair process. Among them, *TNF- α* plays a central role in initiating inflammation by promoting the activation of endothelial cells and the production of other inflammatory cytokines (Horiuchi *et al.*, 2010). In this study, under basal conditions, MTA Repair HP (Angelus) increased the expression of *TNF- α* ; however, under infectious-inflammatory conditions (LPS and LPS plus IFN- γ), both repair sealers decreased the expression of *TNF- α* , indicating an attempt to modulate the infectious process. These results demonstrate that MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) can act effectively and specifically to control inflammation, promoting a more favorable environment for tissue repair. *TNF- α* is a fundamental pro-inflammatory cytokine in the immune response, participating in the regulation of inflammatory processes and defense against infections (Song *et al.*, 2017).

Another pro-inflammatory cytokine, *IL-1 β* amplifies the inflammatory response by stimulating the expression of cell adhesion molecules (Lopez-Castejon *et al.*, 2011). On the other hand, *IL-6* has a pleiotropic role, influencing the differentiation of lymphocytes, cellular hormones, and the production of acute phase proteins (Lee *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2014). Regarding the expression of *IL-1 β* and *IL-6*, both sealers showed reduced expression compared to the control in the groups treated with LPS and LPS plus IFN- γ , suggesting an ability to minimize the exacerbated inflammatory response. The reduction in *IL-1 β* expression after exposure to MTA Repair HP (Angelus), and Bio C Repair (Angelus) sealers suggest a modulatory effect of these materials on the inflammatory response. Suppression of *IL-1 β* was observed even under exacerbated inflammatory conditions, such as LPS and LPS plus IFN- γ stimulation, which normally induce a robust pro-inflammatory response. This suggests that sealers may act by reducing the activation of the TLR4 mediated inflammatory pathway (activated by LPS) and the inflammatory amplification mediated by IFN- γ (Dinarello *et al.*, 2018). Its regulation to lower levels may indicate a positive impact of repair sealers in minimizing exacerbated inflammation, favoring an environment more conducive to tissue repair. Studies that have evaluated the production of these cytokines in response to endodontic sealers, such as MTA Repair HP (Angelus) and Bio-C Repair (Angelus), are limited. However, research indicates that these materials are not cytotoxic and have low genotoxicity, suggesting a favorable interaction with periapical tissues (Abrão *et al.*, 2023).

On the other hand, *IL-10* is an anti-inflammatory cytokine essential for regulating the inflammatory process, inhibiting the excessive production of pro-inflammatory cytokine, and promoting an environment favorable to tissue repair (York *et al.*, 2024). In this study, the expression of *IL-10* remained unchanged, except for a reduction in the presence of Bio C Repair (Angelus). Unlike previous studies, our results did not show an increase in *IL-10* expression in the presence of MTA Repair HP (Angelus) or Bio C Repair (Angelus) in basal conditions, with a reduction observed only for Bio C Repair (Angelus) in inflammatory conditions (LPS plus IFN- γ). This contrasts with the findings of Pedrosa *et al.* (2022), who reported an increased expression of *IL-10* in dental pulp cells exposed to these repair sealers. Similarly, Wan *et al.* (2021) observed greater expression of *IL-10* in bone marrow mesenchymal stromal cells of mice, particularly with MTA Repair HP (Angelus) under LPS stimulation, highlighting its immunomodulatory role in inflammatory conditions.

Given the findings of this study, the endodontic repair sealers MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) demonstrated a promising biological profile, evidenced by their biocompatibility, stimulation of cell proliferation and migration, in addition to modulation of the inflammatory response. These findings indicate that both materials have the potential to promote tissue repair, making them viable options for clinical application in different endodontic contexts. The choice of the most appropriate sealer must consider not only its physical and chemical properties, but also its biological interaction with the periapical tissues, ensuring a more effective and safe approach. However, it is important to consider the limitations inherent in studies *in vitro*, which, despite providing relevant data, do not completely reproduce the complexity of the clinical environment. Therefore, additional studies, including *in vivo* models and clinical trials, are needed to validate these findings and provide a more comprehensive understanding of the long-term behavior of these sealers and in different clinical conditions.

CONCLUSION

Non-diluted extract (1:1) and its dilution (1:2) of Bio C Repair (Angelus) sealer showed percentages of inhibition against *E. faecalis*. Neither sealer extract presented a toxic effect when in contact with hPDLCs. During the repair process, the diluted extracts (1:2 and 1:4) of bioceramics showed greater cell migration after 48h and this tissue repair response was accompanied by an increase in cell proliferation. Finally, in different *in vitro* immunoinflammatory conditions, both MTA Repair HP (Angelus) and Bio C Repair (Angelus) modulated immune responses by reducing or maintaining *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, and *IL-10* gene expression at basal levels. These effects highlight their potential to balance inflammation and support tissue repair and regeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305242/2022), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (88887.724415/2022-00), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) (00193– 00000782/2021-63 and 00193- 00001118/2021-31).

CONFLICTS OF INTEREST

There is no conflict of interest.

REFERENCES

Abrão, Suene Moçato Siguematsu, et al. "Cytotoxicity and genotoxicity of Bio-C Repair, Endosequence BC Root Repair, MTA Angelus and MTA Repair HP." *Brazilian Dental Journal* 34.2 (2023): 14-20. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-6440202305047>

Akira, Shizuo; Takeda, Kiyoshi. (2004). Toll-like receptor signalling. , 4(7), 499–511. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri1391>

Bidar M, Eslami N, Naghavi N, Fasihi Z, Attaran Mashhadi N. The effect of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the compressive strength of mineral trioxide aggregate. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2015 Winter;9(1):1-5. Available from: <https://doi.org/10.15171/joddd.2015.001>

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. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-6440202304974>

Candeiro, G. T. M.; Moura-Netto, C.; D'Almeida-Couto, R. S.; Azambuja-Júnior, N.; Marques, M. M.; Cai, S.; Gavini, G. (2015). Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *International Endodontic Journal*, (), n/a–n/a. Available from: <https://doi.org/10.1111/iej.12523>

Chakar, Sandra; Changotade, Sylvie; Osta, Nada; Khalil, Issam (2017). Cytotoxic evaluation of a new ceramic-based root canal sealer on human fibroblasts. *European Journal of Dentistry*, 11(2), 141–148. Available from: https://doi.org/10.4103/ejd.ejd_2_17

Chen I, Salhab I, Setzer FC, Kim S, Nah HD. A New Calcium Silicate-based Bioceramic Material Promotes Human Osteo- and Odontogenic Stem Cell Proliferation and Survival via the Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling Pathway. *J Endod*. 2016 Mar;42(3):480-6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.11.013>

CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard*, CLSI, United States, 2003.

Collado-González, Mar; López-García, Sergio; García-Bernal, David; Oñate-Sánchez, Ricardo E.; Tomás-Catalá, Christopher J.; Moraleda, Jose M.; Lozano, Adrián; Forner, Leopoldo; Rodríguez-Lozano, Francisco J. (2019). Biological effects of acid-eroded MTA Repair HP and ProRoot MTA on human periodontal ligament stem cells. *Clinical Oral Investigations*, Available from: <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02822-2>

Cui A, Huang T, Li S, Ma A, Pérez JL, Sander C, Keskin DB, Wu CJ, Fraenkel E, Hacohen N. Dictionary of immune responses to cytokines at single-cell resolution. *Nature*. 2024 Jan;625(7994):377-384. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06816-9>

da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018 Aug;51(8):829-846. Available from: <https://doi.org/10.1111/iej.12906>

Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *J Investig Clin Dent*. 2017 May;8(2). Available from: <https://doi.org/10.1111/jicd.12195>

Delfino, M. M., Abreu Jampani, J. L., Lopes, C. S., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Tanomaru-Filho, M., Sasso-Cerri, E., & Cerri, P. S. (2021). Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with White MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *International Endodontic Journal*, 54(9), 1597–1613. Available from: <https://doi.org/10.1111/iej.13567>

Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018 Jan;281(1):8-27. Available from: <https://doi.org/10.1111/imr.12621>

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000 Aug;118(2):503-8. Available from: <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>

Dong X, Xu X. Bioceramics in Endodontics: Updates and Future Perspectives. *Bioengineering (Basel)*. 2023 Mar 13;10(3):354. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030354>

Estrela C, Decurcio DA, Rossi-Fedele G, Silva JA, Guedes OA, Borges ÁH. Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials. *Braz Oral Res*. 2018 Oct 18;32(suppl 1):e73. Available from: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0073>

Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Rodríguez-Lozano FJ, Silva EJNL. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep.* 2019 Mar 8;9(1):3933. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40365-4>

Ghilotti J, Sanz JL, López-García S, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C, Rodríguez-Lozano FJ, Forner L, Spagnuolo G. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. *Materials (Basel).* 2020 May 10;13(9):2189. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma13092189>

Holdsworth SR, Gan PY. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015 Dec 7;10(12):2243-54. Available from: <https://doi.org/10.2215/CJN.07590714>

Iandolo A. Modern Endodontics. *Dent J (Basel).* 2022 Dec 30;11(1):11. Available from: <https://doi.org/10.3390/dj11010011>

International Organization for Standardization. 10993-5. *Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Test for in Vitro Cytotoxicity.* International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland: 2009.

Jiménez-Sánchez MC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. A Microstructure Insight of MTA Repair HP of Rapid Setting Capacity and Bioactive Response. *Materials (Basel).* 2020 Apr 2;13(7):1641. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma13071641>

Janini ACP, Bombarda GF, Pelepenko LE, Marciano MA. Antimicrobial Activity of Calcium Silicate-Based Dental Materials: A Literature Review. *Antibiotics.* 2021; 10(7):865. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070865>

Lee C, Song M. Failure of Regenerative Endodontic Procedures: Case Analysis and Subsequent Treatment Options. *J Endod.* 2022 Sep;48(9):1137-1145. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.06.002>

Lee SY, Buhimschi IA, Dulay AT, Ali UA, Zhao G, Abdel-Razeq SS, Bahtiyar MO, Thung SF, Funai EF, Buhimschi CS. IL-6 trans-signaling system in intra-amniotic inflammation, preterm birth, and preterm premature rupture of the membranes. *J Immunol.* 2011 Mar 1;186(5):3226-36. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003587>

Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuária AP, Silva TA, *et al.* Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J Endod.* 2015 Jul;41(7):1061-5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.016>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*,25(4),402408. Available from: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

López-García S, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, Guerrero-Gironés J, Moraleda JM, Murcia L, Rodríguez-Lozano FJ. Biological Effects of New Hydraulic Materials on Human Periodontal Ligament Stem Cells. *J Clin Med.* 2019 Aug 14;8(8):1216. Available from: <https://doi.org/10.3390/jcm8081216>

Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Aug;22(4):189-95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>

Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2016 Jul;40(4):480-93. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>

Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. *J Endod.* 2014 Nov;40(11):1746-51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.019>

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. Available from: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Palczewska-Komsa M, Kaczor-Wiankowska K, Nowicka A. New Bioactive Calcium Silicate Cement Mineral Trioxide Aggregate Repair High Plasticity (MTA HP)- A Systematic Review. *Materials (Basel)*. 2021 Aug 14;14(16):4573. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma14164573>

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):16-27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>

Pedrosa MDS, Vilela HDS, Rahhal JG, Bueno NP, Lima FS, Nogueira FN, Sipert CR. Exposure to lipopolysaccharide and calcium silicate-based materials affects the behavior of dental pulp cells. *Braz Dent J*. 2022 Sep-Oct;33(5):9-17. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-6440202204990>

Queiroz MB, Inada RNH, Lopes CS, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Bioactive potential of Bio-C Pulpo is evidenced by presence of birefringent calcite and osteocalcin immunoexpression in the rat subcutaneous tissue. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022 Oct;110(10):2369-2380. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35083>

Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater*. 2021 Feb;37(2):311-320. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.11.014>

Silva PAO, Martins DCM, de Castro Cantuária AP, de Andrade RV, Lacorte C, de Almeida JA, Aguiar LR, Corrêa JR, da Silva IGM, Franco OL, Rezende TMB. Host defense peptides combined with MTA extract increase the repair in dental pulp cells: in vitro and ex vivo study. *Sci Rep.* 2023 Jun 12;13(1):9531. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36748-3>

Song W, Li S, Tang Q, Chen L, Yuan Z. *In vitro* biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based bioceramics in endodontics (Review). *Int J Mol Med.* 2021 Jul;48(1):128. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4961>

Song C, Hotz-Wagenblatt A, Voit R, Grummt I. SIRT7 and the DEAD-box helicase DDX21 cooperate to resolve genomic R loops and safeguard genome stability. *Genes Dev.* 2017 Jul 1;31(13):1370-1381. Available from: <https://doi.org/10.1101/gad.300624.117>

Tian J, Zhang Y, Lai Z, Li M, Huang Y, Jiang H, Wei X (2017) Ion release, microstructural, and biological properties of iRoot BP plus and ProRoot MTA exposed to an acidic environment. *J Endod* 43(1):163–168. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.011>

Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, Lozano A, Castelo-Baz P, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2017 Dec;50 Suppl 2:e63-e72. Available from: <https://doi.org/10.1111/iej.12859>

Torabinejad, M., & White, S. N. (2016). Endodontic treatment options after unsuccessful initial root canal treatment. *The Journal of the American Dental Association*, 147(3), 214–220. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2015.11.017>

Toubes KS, Tonelli SQ, Girelli CFM, Azevedo CGS, Thompson ACT, Nunes E, Silveira FF. Bio-C Repair - A New Bioceramic Material for Root Perforation Management: Two Case Reports. *Braz Dent J.* 2021 Jan-Feb;32(1):104-110. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-6440202103568>

Travassos, R. M. C.; Negreiros, J. H. C. N.; Farias, W. D. da S.; Soares, T. B. P.; Barbosa, L. M.; Souza, T. G. dos S. ; Da Silva, H. J. . Apicectomy and retrograde tooth filling with internal root calcification: case report. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e327997390, 2020. Available from: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7390>

Tsesis I, Fuss Z. Diagnosis and treatment of accidental root perforations. *Endod Topics.* 2006 Mar;13(1):95-107. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2006.00213.x>

Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkuppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods.* 1994 Sep 14;174(1-2):311-20. Available from: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90034-5)

Waltimo, T. M. T., Haapasalo, M., Zehnder, M., & Meyer, J. (2004). *Clinical aspects related to endodontic yeast infections.* *Endodontic Topics*, 9(1), 66–78. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2004.00086.x>

Wang D, Haapasalo M, Gao Y, Ma J, Shen Y. Antibiofilm peptides against biofilms on titanium and hydroxyapatite surfaces. *Bioact Mater.* 2018 Jun 28;3(4):418-425. doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.06.002. Erratum in: *Bioact Mater.* 2020 Dec 04;6(6):1789-1790. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.009>

Wan, Qian-Qian et al. Immunomodulatory effects of tricalcium silicate-based cements on osteogenesis. *Applied Materials Today*, v. 24, p. 101145, 2021. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101145>

Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014 Nov;70(1):11-20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.024>

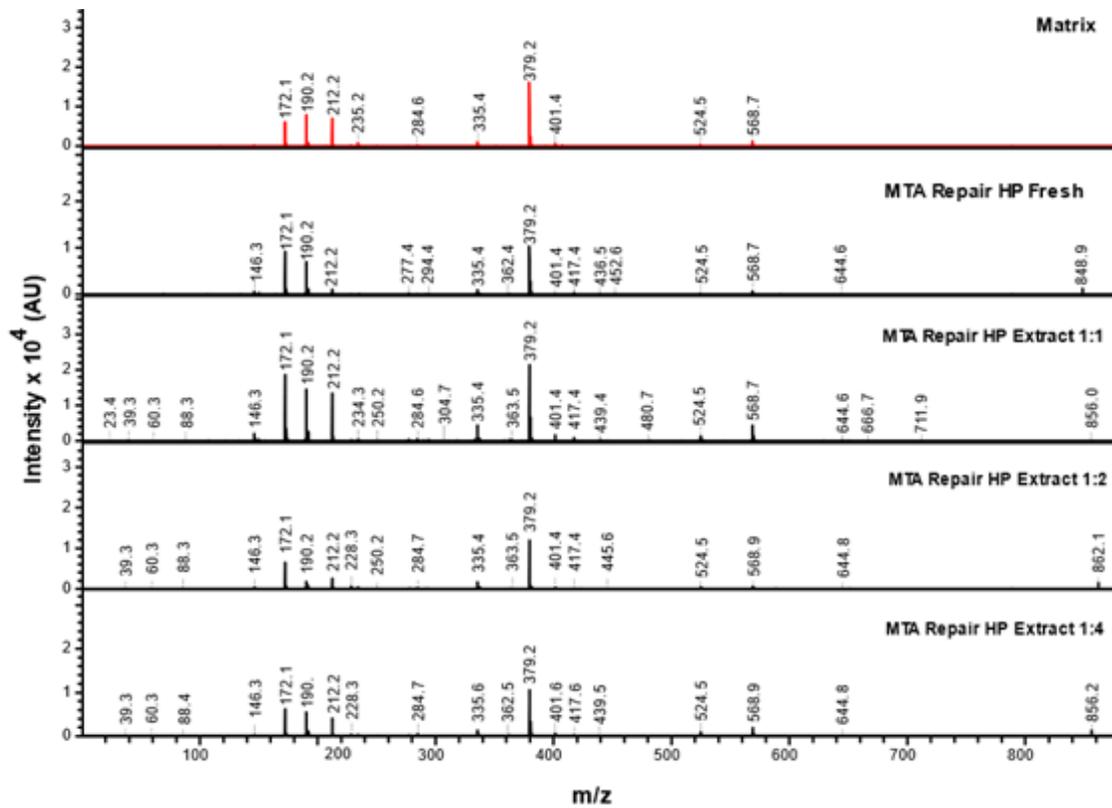
York AG, Skadow MH, Oh J, Qu R, Zhou QD, Hsieh WY, Mowel WK, Brewer JR, Kaffe E, Williams KJ, Kluger Y, Smale ST, Crawford JM, Bensinger SJ, Flavell RA. IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. *Nature*. 2024 Mar;627(8004):628-635. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07098-5>

Zafar K, Jamal S, Ghafoor R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. *J Pak Med Assoc*. 2020 Mar;70(3):497-504. Available from: <https://doi.org/10.5455/JPMA.16942>

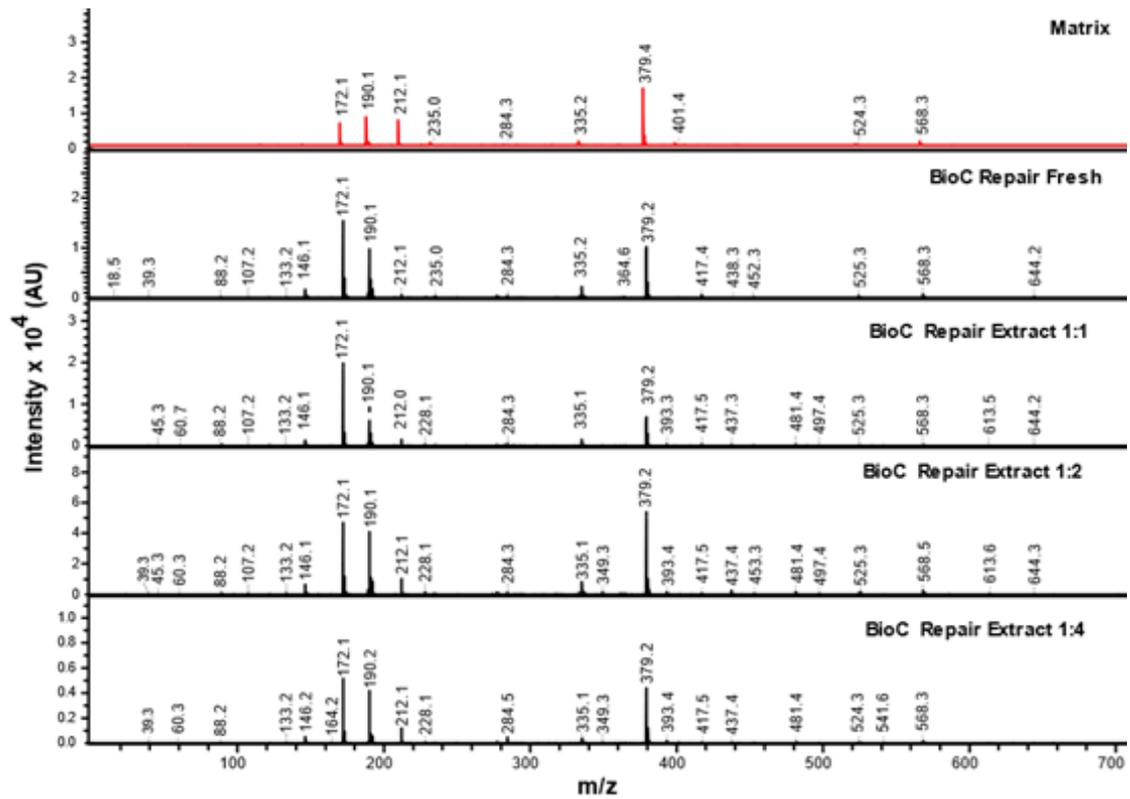
Zhekov KI, Stefanova VP. Definition and Classification of Bioceramic Endodontic Sealers. *Folia Med (Plovdiv)*. 2021 Dec 31;63(6):901-904. Available from: <https://doi.org/10.3897/folmed.63.e58912>

Zamparini F, Siboni F, Prati C, Taddei P, Gandolfi MG (2018) Properties of calcium silicate-monobasic calcium phosphate materials for endodontics containing tantalum pentoxide and zirconium oxide. *Clin Oral Investig* 23:445–457. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2453-7>

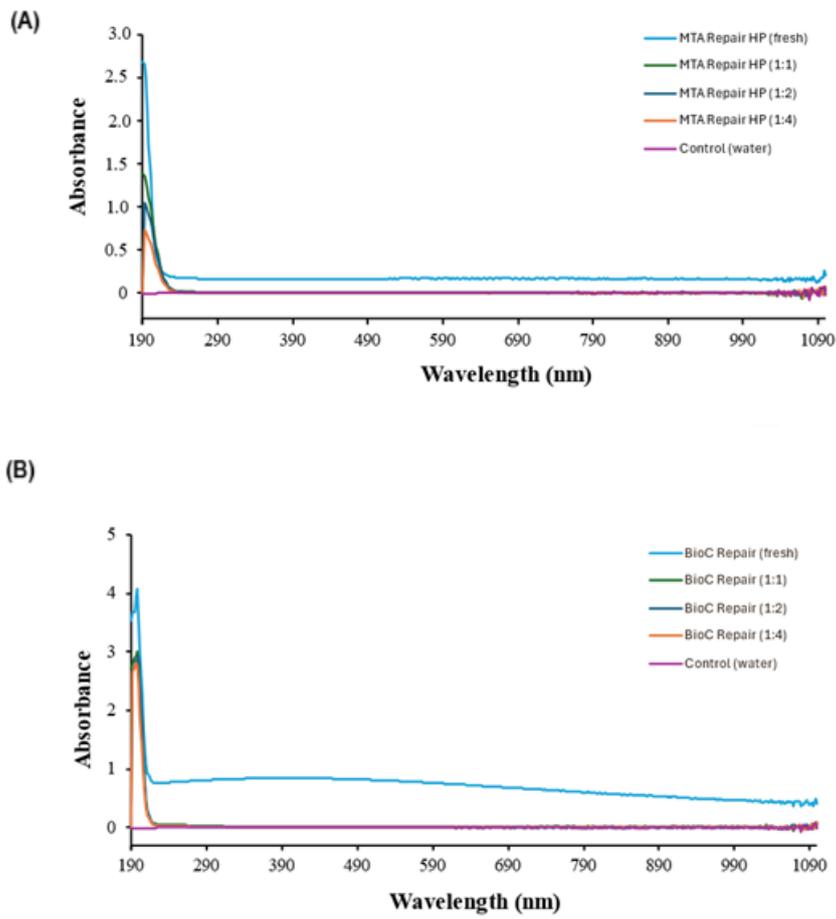
SUPPLEMENTARY FIGURES



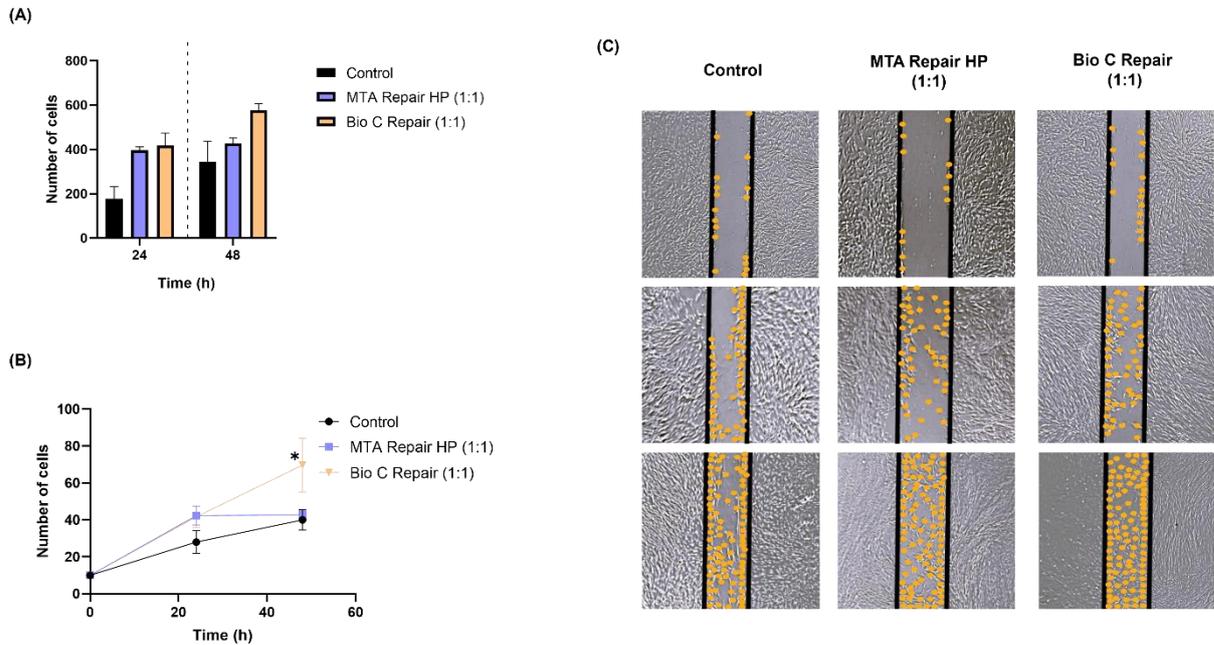
SUPPLEMENTARY FIGURE 1: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS/MS) spectra of the fresh prepared MTA Repair HP and its diluted extracts. The mass spectra were acquired in reflective mode with a mass range of 20–1000 (m/z).



SUPPLEMENTARY FIGURE 2: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS/MS) spectra of the fresh prepared Bio C Repair and its diluted extracts. The mass spectra were acquired in reflective mode with a mass range of 20–1000 (m/z).



SUPPLEMENTARY FIGURE 3: UV/VIS absorption spectra of the fresh prepared cement and its diluted extracts: (A) MTA Repair HP and (B) Bio C Repair. Water was used as control.



SUPPLEMENTARY FIGURE 4: Cell migration and proliferation assays in hPDLCs. Cell migration was evaluated in contact with MTA Repair HP and Bio C Repair extracts (1:1), after 24 and 48h. (A) Number of cells in contact with non-diluted MTA Repair HP and Bio C Repair extract that migrated to the wound after 24h and 48h. No statistical differences were found by ANOVA and Tukey's post-test. (B) Proliferation of hPDLCs by the trypan blue method after 24h. * $p < 0.05$ represents statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test compared to the control group at 48h. (C) Representative image of the cell migration test. Dots indicate the presence of cells in the wound.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo destacam aspectos importantes sobre o desempenho dos cimentos endodônticos de reparo MTA *Repair HP* (Angelus) e Bio C *Repair* (Angelus) ampliando nossa compreensão sobre suas propriedades biológicas e suas possíveis implicações na prática clínica. Em relação à atividade antimicrobiana, foi evidenciado que o Bio C *Repair* (Angelus) apresentou um pequeno percentual de inibição contra *E. faecalis* e ausência de inibição contra *C. albicans*. Por outro lado, o MTA *Repair HP* (Angelus) não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhum dos microrganismos testados, ressaltando a importância de sua aplicação após prévia descontaminação do local de aplicação por outros métodos.

No que diz respeito à biocompatibilidade, ambos os materiais demonstraram ser altamente seguros, não apresentando efeitos tóxicos quando em contato com células do ligamento periodontal humano. Esse achado reforça a adequação de ambos os cimentos para aplicação clínica, uma vez que a ausência de toxicidade celular é um critério essencial para materiais destinados à reparação tecidual. Adicionalmente, os cimentos demonstraram promover uma resposta proliferativa e migratória celular eficaz após 48h, indicando um potencial favorável para a regeneração tecidual em áreas de reparo endodôntico, como perfurações radiculares e selamentos apicais. Além disso, ambos os cimentos influenciaram a resposta inflamatória de forma positiva, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias (*TNF- α* , *IL-1 β* e *IL-6*) e mantendo a expressão de *IL-10*, uma citocina anti-inflamatória, sob condições inflamatórias simuladas *in vitro*. Esses achados sugerem que os materiais podem modular o ambiente inflamatório para favorecer o reparo tecidual, especialmente em situações clínicas que envolvam lesões perirradiculares inflamatórias.

Embora a atividade antimicrobiana do Bio C *Repair* (Angelus) tenha sido limitada, do ponto de vista clínico, suas propriedades relacionadas à migração e proliferação celular, bem como seu potencial imunomodulador, são aspectos mais relevantes para o sucesso do tratamento. Por outro lado, o MTA *Repair HP* (Angelus), sem atividade antimicrobiana observada neste estudo, se destaca como uma alternativa igualmente segura e eficaz em termos de biocompatibilidade e regeneração tecidual. Sua estabilidade e facilidade de manipulação torna-o ideal para

procedimentos que requerem precisão, como em perfurações de difícil acesso ou em áreas que necessitam de selamento apical confiável.

Ademais, as diferenças na composição dos cimentos podem justificar variações nas respostas biológicas observadas. O MTA *Repair HP* (Angelus) contém trióxido mineral agregado com silicatos de cálcio e tungstato de cálcio como radiopacificador, enquanto o Bio C *Repair* (Angelus) é um cimento que apresenta silicatos de cálcio, aluminatos e óxidos metálicos, além de um perfil químico que pode influenciar a liberação de íons e a interação com os tecidos periapicais. Essas diferenças podem impactar diretamente em sua bioatividade, podendo levar a diferentes respostas celulares e diferente perfil de modulação da inflamação.

Com base nesses achados *in vitro*, é possível concluir que ambos os materiais possuem qualidades únicas que atendem a diferentes exigências clínicas, reforçando a importância de uma avaliação criteriosa ao selecionar o cimento mais adequado para cada situação. Enquanto o Bio C *Repair* (Angelus) oferece vantagens em cenários que demandam uma barreira adicional contra microrganismos patogênicos, o MTA *Repair HP* (Angelus) permanece como uma escolha sólida em tratamentos focados na biocompatibilidade e na regeneração tecidual. Assim, a personalização do tratamento endodôntico, fundamentada nas propriedades distintas desses materiais, surge como uma estratégia promissora para maximizar o sucesso clínico e promover a longevidade dos dentes tratados.

7. REFERÊNCIAS (Dissertação: Introdução e Métodos)

Abigail Moore; Mary Freda Howley; Anne C. O'Connell (2011). *Treatment of open apex teeth using two types of white mineral trioxide aggregate after initial dressing with calcium hydroxide in children.*, 27(3), 166–173. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.00984.x>

Abrão SMS, Gregorio D, Azevedo MKC, Mori GG, Poli-Frederico RC, Maia LP. Cytotoxicity and genotoxicity of Bio-C Repair, Endosequence BC Root Repair, MTA Angelus and MTA Repair HP. *Braz Dent J.* 2023 Mar-Apr;34(2):14-20. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202305047>

Abuarqoub,.; Aslam, ; Jafar, ; Abu Harfil, ; Awidi, (2020). *Biocompatibility of Biodentine® with Periodontal Ligament Stem Cells: In Vitro Study.* *Dentistry Journal*, 8(1), 17–. <https://doi.org/10.3390/dj8010017>

Adib, V., Spratt, D., Ng, Y.-L., & Gulabivala, K. (2004). Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *International Endodontic Journal*, 37(8), 542–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00840.x>

Al-Daafas, A., & Al-Nazhan, S. (2007). Histological evaluation of contaminated furcal perforation in dogs' teeth repaired by MTA with or without internal matrix. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 103(3), e92–e99. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.09.007>

Alghamdi, F., Alhaddad, A. J., & Abuzinadah, S. (2020). Healing of Periapical Lesions After Surgical Endodontic Retreatment: A Systematic Review. *Cureus.* <https://doi.org/10.7759/cureus.6916>

Alghamdi, F., & Shakir, M. (2020). The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus.* <https://doi.org/10.7759/cureus.7257>

AlShwaimi, E., Berggreen, E., Furusho, H., Rossall, J. C., Dobeck, J., Yoganathan, S., Stashenko, P., & Sasaki, H. (2013). IL-17 Receptor A Signaling Is Protective in Infection-Stimulated Periapical Bone Destruction. *The Journal of Immunology*, 191(4), 1785–1791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202194>

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

Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*. 2002 Jun;18(3):134-7. <https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2002.00097.x>. PMID: 12110105.

Asgary, S., Eghbal, M. J., Parirokh, M., Ghanavati, F., & Rahimi, H. (2008). A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 106(4), 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.06.006>

Attik, G. N.; Villat, C.; Hallay, F.; Pradelle-Plasse, N.; Bonnet, H.; Moreau, K.; Colon, P.; Grosogoeat, B. (2014). *In vitro* biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA [®]. *International Endodontic Journal*, 47(12), 1133–1141. <https://doi.org/10.1111/iej.12261>

Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res*. 2012 May;91(5):454-9. <https://doi.org/10.1177/0022034512443068>

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.

Bellizzi R, Loushine R: *Clinical atlas of endodontic surgery*, Chicago, 1991, Quintessence Publishing.

Benetti, Francine; Queiroz, Índia Olinta de Azevedo; Cosme-Silva, Leopoldo; Conti, Leticia Citelli; Oliveira, Sandra Helena Penha de; Cintra, Luciano Tavares Angelo (2019). *Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material*. *Brazilian Dental Journal*, 30(4), 325–332. <http://doi.org/10.1590/0103-6440201902457>

Best SM; A.E. Porter; E.S. Thian; J. Huang (2008). *Bioceramics: Past, present and for the future.*, 28(7), 1319–1327. <http://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001>

Beth Ann Damas; Michelle A. Wheeler; Josef S. Bringas; Michael M. Hoen (2011). *Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials.*, 37(3), 0–375. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.027>

Bonte, Eric; Beslot, Aurélie; Boukpepsi, Tchilalo; Lasfargues, Jean-Jacques (2015). *MTA versus Ca(OH)₂ in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison*. *Clinical Oral Investigations*, 19(6), 1381–1388. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1348-5>

Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod.* 2006 May;32(5):425-8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.009>

Bortoluzzi EA, Araújo GS, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Marginal gingiva discoloration by gray MTA: a case report. *J Endod.* 2007 Mar;33(3):3257. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.012>

Brady JE, Himel VT, Weir JC. Periapical response to an apical plug of dentin filings intentionally placed after root canal overinstrumentation. *J Endod.* 1985 Aug;11(8):323-9. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(85\)80038-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(85)80038-8)

Bramante, Clóvis Monteiro e BERBERT, Alceu. Acidentes e complicações durante os tratamentos endodônticos: possibilidades de correções. *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 34, n. 4, p. 133-145, 1977 Tradução.

Buerlein, Edmund (2007). *Handbook of Biomineralization || Simulated Body Fluid (SBF) as a Standard Tool to Test the Bioactivity of Implants.*, 10.1002/9783527619443(),97109. <https://doi.org/10.1002/9783527619443.ch51>

Bun SAN CHONG; THOMAS R. PITT FORD (2005). *Root-end filling materials: rationale and tissue response.*, 11(1), 114–130. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2005.00164.x>

Byoung-Moo Seo; Masako Miura; Stan Gronthos; Peter Mark Bartold; Sara Batouli; Jaime Brahim; Marian Young; Pamela Gehron Robey; Cun Yu Wang; Songtao Shi (2004). *Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.*, 364(9429), 0–155. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16627-0)

Camilleri, Josette (2015). *Mineral trioxide aggregate: present and future developments. Endodontic Topics*, 32(1), 31–46. <http://doi.org/10.1111/etp.12073>

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. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202304974>

Chala S, Abouqal R, Rida S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: systematic review and meta-analysis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;112(4):e36-42.

Chen, Szu-Ju; Chen, Li-Ping (2016). *Radiographic outcome of necrotic immature teeth treated with two endodontic techniques: A retrospective analysis. Biomedical Journal*, (), S2319417016302499–<https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.12.006>

Cheng, L; Feng Ye; Ruina Yang; Xiaofeng Lu; Yujun Shi; Li Li; Hongsong Fan; Hong Bu (2010). *Osteoinduction of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula.*, 6(4), 1569–1574. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.050>

Cohen S, Hargreaves KM, Al E. *Caminhos da polpa*. 10. ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2011.

Collado-González, Mar; López-García, Sergio; García-Bernal, David; Oñate-Sánchez, Ricardo E.; Tomás-Catalá, Christopher J.; Moraleda, Jose M.; Lozano, Adrián; Forner, Leopoldo; Rodríguez-Lozano, Francisco J. (2019). *Biological effects of acid-eroded MTA Repair HP and ProRoot MTA on human periodontal ligament stem cells. Clinical Oral Investigations*, (), –. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02822-2>

Costa Junior, Edson Dias; Souza-Filho, Francisco José de; Barbosa, Sérgio Valmor (2003). *Tissue reactions to a component of root canal system bacteria: lipoteichoic acid. Brazilian Dental Journal*, 14(2), 95–98. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402003000200004>

Cotti, E., Schirru, E., Acquas, E., & Usai, P. (2014). An Overview on Biologic Medications and Their Possible Role in Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*, 40(12), 1902–1911. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.013>

Damle SG, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent*. 2012 Spring;36(3):263-8. PMID: 22838228.

Darren Hess; Eric Solomon; Robert Spears; Jianing He (2011). *Retreatability of a Bioceramic Root Canal Sealing Material.*, 37(11), 0–1549. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.016>

Del Fabbro M, Corbella S, Sequeira-Byron P, Tsesis I, Rosen E, Lolato A, Taschieri S. Endodontic procedures for retreatment of periapical lesions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Oct 19;10(10):CD005511. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005511.pub3>

Dong X, Xu X. Bioceramics in Endodontics: Updates and Future Perspectives. *Bioengineering (Basel).* 2023 Mar 13;10(3):354. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030354>

D. Ricucci, J.F. Siqueira Jr., W.S.P. Lopes, A.R. Vieira, I.N. Rôças, Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series, *J. Endod.* 41 (2015) 265–273 <https://doi:10.1016/j.joen.2014.08.020>

Drukteinis, S., Peciuliene, V., Shemesh, H., Tusas, P., & Bendinskaite, R. (2019). Porosity Distribution in Apically Perforated Curved Root Canals Filled with Two Different Calcium Silicate Based Materials and Techniques: A Micro-Computed Tomography Study. *Materials*, 12(11), 1729. <https://doi.org/10.3390/ma1211172910.3390/ma12111729>

Duarte MAH, El Kadre GDO, Vivan RR, Tanomaru JMG, Tanomaru Filho M, Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009 May;35(5):737-40. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.02.006>

Dylewski JJ. Apical closure of nonvital teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1971;32(1):82-9.

Ehsani, M; Dehghani, a; Abesi, F; Khafri, S; {Ghadiri Dehkordi}, S (2014). *Evaluation of Apical Micro-leakage of Different Endodontic Sealers in the Presence and Absence of Moisture. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 8(3), 125–129. <https://doi.org/10.5681/joddd.2014.023>

Eliyas, S., Vere, J., Ali, Z., & Harris, I. (2014). Micro-surgical endodontics. *British Dental Journal*, 216(4), 169–177. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.142>

Escobar-García, Diana María; Aguirre-López, Eva; Méndez-González, Verónica; Pozos-Guillén, Amaury (2016). *Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine <i>™</i>) Used as Root-End Filling Materials*. *BioMed Research International*, 2016(), 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/7926961>

Estrela, Carlos; Holland, Roberto (2003). *Calcium hydroxide: study based on scientific evidences*. *Journal of Applied Oral Science*, 11(4), 269–282. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572003000400002>

Estrela C, Biffi JC, Moura MS, Lopes HP. Treatment of endodontic failure. In: Estrela C. *Endodontic Science*. 2nd ed. São Paulo: Artes Médicas; 2009. p. 917-52.

Estrela, C; Decurcio, Daniel de Almeida; Rossi-Fedele, Giampiero; Silva, Julio Almeida; Guedes, Orlando Aguirre; Borges, Álvaro Henrique (2018). Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials. *Brazilian Oral Research*, 32(suppl 1). <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0073>

Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Rodríguez-Lozano FJ, Silva EJNL. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep*. 2019 Mar 8;9(1):3933. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40365-4>

Fillingham, Y.; Jacobs, J. (2016). *Bone grafts and their substitutes*. *The Bone & Joint Journal*, 98-B(1_Supple_A), 6–9. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.98B.36350>

Frank AL, Weine FS. Nonsurgical therapy for the perforative defect of internal resorption. *J Am Dent Assoc*. 1973 Oct;87(4):863-8. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1973.0526>

Frank, Alfred L. (1966). *Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation*. *The Journal of the American Dental Association*, 72(1), 87–93. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1966.0017>

Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod.* 2003 Dec;29(12):814-7. <https://doi.org/10.1097/00004770-200312000-00007>

Fuss Z, Trope M. Root perforations: classification and treatment choices based on prognostic factors. *Endod Dent Traumatol.* 1996 Dec;12(6):255-64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1996.tb00524.x>

Galler, K. M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M., & Feuerer, M. (2021). Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1480. <https://doi.org/10.3390/ijms22031480>

Gawthaman, Murugesan; Karunakaran, Ramachandran; Vinodh, Selvaraj; Mathian, VeerabadhranMahesh; Vijayaraghavan, Rangasamy (2013). *Apexification with calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate: Report of two cases.* *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(6), 131–. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.114305>

Geoffrey S. Heithersay (1975). *Calcium Hydroxide in the Treatment of Pulpless Teeth with Associated Pathology.*, 8(2), 74–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1975.tb01000.x>

Geoffrey S. Heithersay (1970). *Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth.*, 29(4), 620–630. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(70\)90474-3](https://doi.org/10.1016/0030-4220(70)90474-3)

Ghose, Leonora J.; Baghdady, Virgin S.; Hikmat, Ban Y.M. (1987). *Apexification of immature apices of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide.* *Journal of Endodontics*, 13(6), 285–290. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(87\)80045-6](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(87)80045-6)

Giacomino, Christin Michelle; Wealleans, James A.; Kuhn, Natalia; Diogenes, Anibal (2019). *Comparative Biocompatibility and Osteogenic Potential of Two Bioceramic Sealers*. *Journal of Endodontics*, 45(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.08.007>

Goldberg, M., Njeh, A., & Uzunoglu, E. (2015). Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/347649>

Gomes, Brenda P.F.A.; Vianna, Morgana E.; Zaia, Alexandre A.; Almeida, José Flávio A.; Souza-Filho, Francisco J.; Ferraz, Caio C. R. (2013). *Chlorhexidine in Endodontics*. *Brazilian Dental Journal*, 24(2), 89–102. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302188>

Gomes, B. P. F. de A., & Herrera, D. R. (2018). Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Brazilian Oral Research*, 32(suppl 1). <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069>

Göran Sundqvist; David Figdor; Sten Persson; Ulf Sjögren (1998). *Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment.*, 85(1), 0–93. [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(98)90404-8)

Graves, D. T., Oates, T., & Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 3(1), 5304. <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5304>

Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2012 Jan 1;2(4):e1. <https://doi.org/10.5037/jomr.2011.2401>

Gunnel Svensäter; Gunnar Bergenholtz. (2004). *Biofilms in endodontic infections.* , 9(1), 27–36. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2004.00112.x>

Haji-Hassani, N., Bakhshi, M., & Shahabi, S. (2015). Frequency of Iatrogenic Errors through Root Canal Treatment Procedure in 1335 Charts of Dental Patients. *Journal of International Oral Health: JIOH*, 7(Suppl 1), 14–17.

Hakki SS, Bozkurt BS, Ozcopur B, Gandolfi MG, Prati C, Belli S. The response of cementoblasts to calcium phosphate resin-based and calcium silicate-based commercial sealers. *Int Endod J*. 2013 Mar;46(3):242-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02122.x>

Hakki, S.S; S. B. Bozkurt; B. Ozcopur; N. Purali; S. Belli (2012). *Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials – a laboratory study.*, 45(3), 240–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01968.x>

Hansen SW; J. Gordon Marshall; Christine M. Sedgley (2011). *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.*, 37(4), 0–506. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.010>

Haapasalo, M.; Shen, Y.; Wang, Z.; Gao, Y. (2014). *Irrigation in endodontics.* *BDJ*, 216(6), 299–303. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.204>

Harrison JW. Surgical management of endodontically treated teeth. *Curr Opin Dent*. 1992 Jun; 2:115-21. PMID: 1520920.

Holland R, Otobani Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Dezan Junior E. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod*. 2001 Apr;27(4):281-4. <https://doi.org/10.1097/00004770-200104000-00011>

Holland GR. Periapical response to apical plugs of dentin and calcium hydroxide in ferret canines. *J Endod*. 1984 Feb;10(2):71-4. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(84\)80040-0](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(84)80040-0)

Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Apr;73(1):123-8. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30182>

Igor Tsesis; Ester Rosenberg; Vadim Faivishevsky; Anda Kfir; Menahem Katz; Eyal Rosen (2010). *Prevalence and Associated Periodontal Status of Teeth with Root Perforation: A Retrospective Study of 2,002 Patients' Medical Records.*, 36(5), 0–800. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.012>

J.C. Steiner; H.J. Van Hassel (1971). *Experimental root apexification in primates.* , 31(3), 409–415. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(71\)90163-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(71)90163-0)

Jang, M.-A., Kim, E. K., Now, H., Nguyen, N. T. H., Kim, W.-J., Yoo, J.-Y., Lee, J., Jeong, Y.-M., Kim, C.-H., Kim, O.-H., Sohn, S., Nam, S.-H., Hong, Y., Lee, Y. S., Chang, S.-A., Jang, S. Y., Kim, J.-W., Lee, M.-S., Lim, S. Y., ... Ki, C.-S. (2015). Mutations in DDX58, which Encodes RIG-I, Cause Atypical Singleton-Merten Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 96(2), 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.019>

Jimenez-Sanchez, MC; Segura-Egea, JJ; Diaz-Cuenca, A (2019). *MTA HP Repair stimulates in vitro an homogeneous calcium phosphate phase coating deposition.* *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, (), 0–0. <https://doi.org/10.4317/jced.55661>

Jitaru, Stefan; Hodisan, Ioana; Timis, Lucia; Lucian, Anamaria; Bud, Marius (2016). *THE USE OF BIOCERAMICS IN ENDODONTICS - LITERATURE REVIEW.* *Clujul Medical*, 89(4), 470–. <https://doi.org/10.15386/cjmed-612>

J. Soares; S. Santos; C. César; P. Silva; M. Sá; F. Silveira; E. Nunes (2008). *Calcium hydroxide induced apexification with apical root development: a clinical case report.*, 41(8), 710–719. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01415.x>

Johnson, B. R. (1999). Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 87(4), 398–404. [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(99\)70237-4](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(99)70237-4)

Kakani, A. K. (2015). A Review on Perforation Repair Materials. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13854.6501>

Koch KA, Brave GD, Nasseh AA. Bioceramic technology: closing the endo-restorative circle, part 2. *Dentistry Today*. 2010 Mar;29(3):98, 100, 102-5. PMID: 20333859.

Kvinnslund, I., OSWALD, R. J., HALSE, A., & GRØNNINGSÆTER, A. G. (1989). A clinical and roentgenological study of 55 cases of root perforation. *International Endodontic Journal*, 22(2), 75–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1989.tb00509.x>

Kohli, M. R., Berenji, H., Setzer, F. C., Lee, S.-M., & Karabucak, B. (2018). Outcome of Endodontic Surgery: A Meta-analysis of the Literature—Part 3: Comparison of Endodontic Microsurgical Techniques with 2 Different Root-end Filling Materials. *Journal of Endodontics*, 44(6), 923–931. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.02.021>

Kumar A, Yadav A, Shetty N. One-step apexification using platelet rich fibrin matrix and mineral trioxide aggregate apical barrier. *Indian J Dent Res*. 2014 Nov-Dec;25(6):809-12. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.152210> PMID: 25728119.

Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):970-4. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.021>

Lee, S.-J., Monsef, M., & Torabinejad, M. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics*, 19(11), 541–544. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)81282-3](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(06)81282-3)

Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuária AP, Silva TA, de Freitas CG, Dias SC, Franco OL, Rezende TM. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J Endod*. 2015 Jul;41(7):1061-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.016. Epub 2015 Apr 4. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.016>

Lima, S. M. de F., Sousa, M. G. da C., Freire, M. de S., Almeida, J. A. de, Cantuária, A. P. de C., Silva, T. A. M. e, Freitas, C. G. de, Dias, S. C., Franco, O. L., & Rezende, Martinho, F. C., Leite, F. R. M., Chiesa, W. M. M., Nascimento, G. G., Feres, M., & Gomes, B. P. F. A. (2014). Signaling Pathways Activation by Primary Endodontic Infectious Contents and Production of Inflammatory Mediators. *Journal of Endodontics*, 40(4), 484–489. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.022>

López-García S, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, Guerrero-Gironés J, Moraleda JM, Murcia L, Rodríguez-Lozano FJ. Biological Effects of New Hydraulic Materials on Human Periodontal Ligament Stem Cells. *J Clin Med*. 2019 Aug 14;8(8):1216. <https://doi.org/10.3390/jcm8081216>

Lopes HP, ESTRELA C, SIQUEIRA JF, COSTA FILHO AS. Tratamento conservador pulpar. *Endodontia: biologia e técnica*. Rio de Janeiro: Medsi; p. 223-44; 1999

Loushine BA; Thomas E. Bryan; Stephen W. Looney; Brian M. Gillen; Robert J. Loushine; R. Norman Weller; David H. Pashley; Franklin R. Tay (2011). *Setting Properties and Cytotoxicity Evaluation of a Premixed Bioceramic Root Canal Sealer.*, 37(5), 0–677. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.003>

Loxley EC, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC 3rd. The effect of various intracanal oxidizing agents on the push-out strength of various perforation repair materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Apr;95(4):490-4. <http://doi.org/10.1067/moe.2003.32>

Mahmoud Torabinejad; Noah Chivian (1999). Clinical applications of mineral trioxide aggregate., 25(3), 0–205. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(99\)80142-3](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(99)80142-3)

Martínez-Cortés, Mildred; Tinajero-Morales, Carlos; Rosales, Carlos; Uribe-Querol, Eileen (2017). Cytotoxicity assessment of three endodontic sealing cements used in periapical surgery. In vitro study. *Revista Odontológica Mexicana*, 21(1), e40–e48. <https://doi.org/10.1016/j.rod mex.2017.02.010>

Martinho FC, Leite FR, Chiesa WM, Nascimento GG, Feres M, Gomes BP. Signaling pathways activation by primary endodontic infectious contents and production of inflammatory mediators. *J Endod.* 2014 Apr;40(4):484-9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.022>

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. PMID: 37304416; PMCID: PMC10247870.

Masoud Parirokh; Mahmoud Torabinejad (2010). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action., 36(3), 0–413. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.009>

Matthias Zehnder (2006). Root Canal Irrigants., 32(5), 0–398. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.09.014>

Menezes, R., Bramante, C. M., da Silva Paiva, K. B., Letra, A., Carneiro, E., Fernando Zambuzzi, W., & Granjeiro, J. M. (2006). Receptor activator NF κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 102(3), 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.10.054>

Mente, J., Hufnagel, S., Leo, M., Michel, A., Gehrig, H., Panagidis, D., Saure, D., & Pfefferle, T. (2014). Treatment Outcome of Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide Direct Pulp Capping: Long-term Results. *Journal of Endodontics*, 40(11), 1746–1751. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.019>

Metzger, Z., Huber, R., Slavescu, D., Dragomirescu, D., Tobis, I., & Better, H. (2009). Healing Kinetics of Periapical Lesions Enhanced by the Apexum Procedure: A Clinical Trial. *Journal of Endodontics*, 35(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.019>

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011 Aug;44(8):697-730. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x>

Moraes TG, Menezes AS, Grazziotin-Soares R, Moraes RUME, Ferreira PVC, Carvalho CN, Bauer J, Carvalho EM. Impact of Immersion Media on Physical Properties and Bioactivity of Epoxy Resin-Based and Bioceramic Endodontic Sealers. *Polymers (Basel)*. 2022 Feb 14;14(4):729. <https://doi.org/10.3390/polym14040729>

Mooney GC; Sarah North (2008). *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.*, 24(1), 65–69. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2006.00495.x>

Mu, Sen; Guo, Shuanlong; Wang, Xiang; Zhan, Yuanbo; Li, Ying; Jiang, Ying; Zhang, Ruimin; Zhang, Bin (2017). Effects of deferoxamine on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9579–9586. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7810>

Öğütlü, F., Karaca, İ. Clinical and Radiographic Outcomes of Apical Surgery: A Clinical Study. *J. Maxillofac. Oral Surg.* **17**, 75–83 (2018).
<https://doi.org/10.1007/s12663-017-1008-9>

Oswald RJ. Procedural accidents and their repair. *Dent Clin North Am.* 1979 Oct;23(4):593-616. PMID: 294391.

Palczewska-Komsa M, Kaczor-Wiankowska K, Nowicka A. New Bioactive Calcium Silicate Cement Mineral Trioxide Aggregate Repair High Plasticity (MTA HP)—A Systematic Review. *Materials.* 2021; 14(16):4573.
<https://doi.org/10.3390/ma14164573>

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):16-27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>

Parirokh, M; Torabinejad, M; Dummer, P M H (2017). Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: An updated overview- Part I: Vital pulp therapy. *International Endodontic Journal*, (). <https://doi.org/10.1111/iej.12841>

Paula-Silva, F. W. G., Arnez, M. F. M., Petean, I. B. F., Almeida-Junior, L. A., da Silva, R. A. B., da Silva, L. A. B., & Faccioli, L. H. (2020). Effects of 5-lipoxygenase gene disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis. *Archives of Oral Biology*, *112*, 104670.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104670>

Raghavendra SS, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P. Bioceramics in endodontics - a review. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2017 Dec 2;51(3 Suppl 1):S128-S137.
<https://doi.org/10.17096/jiufd.63659>

Regan JD, Fleury AA. Irrigants in non-surgical endodontic treatment. *J Ir Dent Assoc.* 2006 Autumn;52(2):84-92. PMID: 16989370.

Rezende TM, Vieira LQ, Sobrinho AP, Oliveira RR, Taubman MA, Kawai T. The influence of mineral trioxide aggregate on adaptive immune responses to endodontic pathogens in mice. *J Endod.* 2008 Sep;34(9):1066-71. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.06.006>

Roberto Holland; José Arlindo Otoboni Filho; Valdir de Souza; Mauro Juvenal Nery; Pedro Felício Estrada Bernabé; Eloi Dezan Junior (2001). *Mineral Trioxide Aggregate Repair of Lateral Root Perforations.*, 27(4), 0–284. <https://doi.org/10.1097/00004770-200104000-00011>

Roda RS. Root perforation repair: surgical and nonsurgical management. *Practical Procedures & Aesthetic Dentistry: PPAD.* 2001 Aug;13(6):467-72; quiz 474. PMID: 11544819.

Rôças IN; José F. Siqueira Jr; Kátia R.N. Santos (2004). *Association of Enterococcus faecalis With Different Forms of Periradicular Diseases.*, 30(5), 0–320. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00004>

Ruddle CJ. Nonsurgical endodontic retreatment. In: Cohen S, Burns RC, editors. *Pathways of the pulp.* 8th ed. St Louis: Mosby; 2002. p. 875-929.

Ruksakiet, Kasidid; HanĀjk, Lilla; Farkas, Nelli; Hegyi, PĀĉter; Sadaeng, Wuttapon; Czumbel, LĀjszlĀ³ MĀĵrk; Sang-ngoan, Thanyaporn; Garami, AndrĀjs; MikĀ³, Alexandra; Varga, GĀĵbor; Lohinai, Zsolt (2020). *Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and sodium hypochlorite in root canal disinfection: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.* *Journal of Endodontics*, S0099239920303083 <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.05.002>

Ryu, Y. H., Baik, J. E., Yang, J. S., Kang, S.-S., Im, J., Yun, C.-H., Kim, D. W., Lee, K., Chung, D. K., Ju, H. R., & Han, S. H. (2009). Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *International Immunopharmacology*, 9(1), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.10.014>

Saed, S. Mohammed; Ashley, M. P.; Darcey, J. (2016). *Root perforations: aetiology, management strategies and outcomes. The hole truth. BDJ*, 220(4), 171–180. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.132>

Safi, C., Kohli, M. R., Kratchman, S. I., Setzer, F. C., & Karabucak, B. (2019). Outcome of Endodontic Microsurgery Using Mineral Trioxide Aggregate or Root Repair Material as Root-end Filling Material: A Randomized Controlled Trial with Cone-beam Computed Tomographic Evaluation. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.03.014>

Saoud, T., Ricucci, D., Lin, L., & Gaengler, P. (2016). Regeneration and Repair in Endodontics—A Special Issue of the Regenerative Endodontics—A New Era in Clinical Endodontics. *Dentistry Journal*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.3390/dj4010003>

Schmidt BS, Zaccara IM, Reis Só MV, Kuga MC, Palma-Dibb RG, Kopper PM. Influence of operating microscope in the sealing of cervical perforations. *J Conserv Dent*. 2016 Mar-Apr;19(2):152-6. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.178695>

Shekhar, Vijay; Shashikala, K. (2013). *Cone Beam Computed Tomography Evaluation of the Diagnosis, Treatment Planning, and Long-Term Followup of Large Periapical Lesions Treated by Endodontic Surgery: Two Case Reports. Case Reports in Dentistry*, 2013(), 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/564392>

Sjögren, U., Hägglund, B., Sundqvist, G., & Wing, K. (1990). *Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. Journal of Endodontics*, 16(10), 498–504. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(07\)80180-4](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(07)80180-4)

Seedat, H., Van Der Vyver, P., & De Wet, F. (2018). Micro-endodontic surgery part 1: Surgical rationale and modern techniques. *South African Dental Journal*. www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00118516201800030007&lng=en&nrm=iso

Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol.* 1991;36(2):117-28. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(91\)90074-5](https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90074-5)

Silva PAO, Lima SMF, Martins DCM, Amorim IA, Lacorte C, de Almeida JA, Franco OL, Rezende TMB. Concentrated MTA Repair HP reduced biofilm and can cause reparative action at a distance. *Int Endod J.* 2021 Oct;54(10):1925-1936. <https://doi.org/10.1111/iej.13592>

Silva PAO, Martins DCM, de Castro Cantuária AP, de Andrade RV, Lacorte C, de Almeida JA, Aguiar LR, Corrêa JR, da Silva IGM, Franco OL, Rezende TMB. Host defense peptides combined with MTA extract increase the repair in dental pulp cells: in vitro and ex vivo study. *Sci Rep.* 2023 Jun 12;13(1):9531. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36748-3>

Silveira CM, Sánchez-Ayala A, Lagravère MO, Pilatti GL, Gomes OM. Repair of furcal perforation with mineral trioxide aggregate: long-term follow-up of 2 cases. *J Can Dent Assoc.* 2008 Oct;74(8):729-33. PMID: 18845064

Sinai, Irving H. (1977). *Endodontic perforations: their prognosis and treatment. The Journal of the American Dental Association*, 95(1), 90–95. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1977.0531>

Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2008). Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of Endodontics*, 34(11), 1291-1301.e3. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.028>

Somma, F., Castagnola, R., Bollino, D., & Marigo, L. (2011). Oral inflammatory process and general health. Part 2: How does the periapical inflammatory process compromise general health? *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15(1), 35–51.

Song W, Li S, Tang Q, Chen L, Yuan Z. *In vitro* biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based bioceramics in endodontics (Review). *Int J Mol Med*. 2021 Jul;48(1):128. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4961>

Souza, M. A., Padilha Rauber, M. G., Zuchi, N., Bonacina, L. V., Ricci, R., Dias, C. T., ... Palhano, H. S. (2019). Influence of final irrigation protocols and endodontic sealer on bond strength of root filling material with root dentin previously treated with photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 26, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.03.013>

Sullivan, M., Gallagher, G., & Noonan, V. (2016). The root of the problem. *The Journal of the American Dental Association*, 147(8), 646–649. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2016.02.018>

Surya Raghavendra, Srinidhi; Jadhav, Ganesh Ranganath; Gathani, Kinjal Mahesh; Kotadia, Pratik (2017). BIOCERAMICS IN ENDODONTICS – A REVIEW. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 51(0), – . <https://doi.org/10.17096/jiufd.63659>

Sutter, E., Valdec, S., Bichsel, D., Wiedemeier, D., Rücker, M., & Stadlinger, B. (2019). Success rate 1 year after apical surgery: a retrospective analysis. *Oral and Maxillofacial Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s10006-019-00815-9>

Tabassum, S., & Khan, F. R. (2016). Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *European Journal of Dentistry*, 10(01), 144–147. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.175682>

Taddei, Paola; Modena, Enrico; Tinti, Anna; Siboni, Francesco; Prati, Carlo; Gandolfi, Maria Giovanna (2014). *Effect of the fluoride content on the bioactivity of calcium silicate-based endodontic cements*. *Ceramics International*, 40(3), 4095–4107. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.08.064>

Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci.* 2007 Mar;49(1):41-5. <https://doi.org/10.2334/josnusd.49.41>

Tian J, Zhang Y, Lai Z, Li M, Huang Y, Jiang H, Wei X (2017) Ion release, microstructural, and biological properties of iRoot BP plus and ProRoot MTA exposed to an acidic environment. *J Endod* 43(1):163–168. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.011>

Tomás-Catalá, Christopher J.; Collado-González, Mar; García-Bernal, David; Oñate-Sánchez, Ricardo E.; Forner, Leopoldo; Llena, Carmen; Lozano, Adrián; Moraleda, José M.; Rodríguez-Lozano, Francisco J. (2017). Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics*, (), S0099239917309068 <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.07.017>

Tomás-Catalá, C J; Collado-González, M; García-Bernal, D; Oñate-Sánchez, R E; Forner, L; Llena, C; Lozano, A; Castelo-Baz, P; Moraleda, J M; Rodríguez-Lozano, F J (2017). *Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. International Endodontic Journal*, (), <https://doi.org/10.1111/iej.12859>

Torabinejad, M., & White, S. N. (2016). Endodontic treatment options after unsuccessful initial root canal treatment. *The Journal of the American Dental Association*, 147(3), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2015.11.017>

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. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(97\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(97)80051-9)

Torabinejad, M., & Parirokh, M. (2010). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part II: Leakage and Biocompatibility Investigations. *Journal of Endodontics*, 36(2), 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.010>

Toubes, Kênia M.; Tonelli, Stéphanie Q.; Oliveira, Bruno J. de; Duarte, Grazielle; Nunes, Eduardo; Silveira, Frank F. (2019). *Apical periodontitis associated with a calculus-like deposit: A case report of a rare fan-shaped manifestation*. *Annals of Medicine and Surgery*, 41(), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.03.003>

Touré B, Faye B, Kane AW, Lo CM, Niang B, Boucher Y. Analysis of reasons for extraction of endodontically treated teeth: a prospective study. *J Endod*. 2011 Nov; 37(11):1512-5. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.07.002>

Travassos, R. M. C.; NEGREIROS, J. H. C. N.; FARIAS, W. D. da S.; SOARES, T. B. P.; BARBOSA, L. M.; SOUZA, T. G. dos S.; DA SILVA, H. J.. Apicectomy and retrograde tooth filling with internal root calcification: case report. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e327997390, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7390>

Trindade, A. C., de Figueiredo, J. A. P., de Oliveira, S. D., Barth Junior, V. C., Gallo, S. W., Follmann, C., ... Weber, J. B. B. (2017). Histopathological, Microbiological, and Radiographic Analysis of Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Study in Rats' Molars. *Photomedicine and Laser Surgery*, 35(7), 364–371. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4102>

Tsesis I, Fuss Z. Diagnosis and treatment of accidental root perforations. *Endod Topics*. 2006 Mar;13(1):95-107. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2006.00213.x>

Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with

acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods*. 1994 Sep 14;174(1-2):311-20.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90034-5)

Wang, Z., de la Fuente-Núñez, C., Shen, Y., Haapasalo, M., & Hancock, R. E. W. (2015). Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. *PLOS ONE*, 10(7), e0132512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132512>

Wei Zhang; Zhi Li; Bin Peng (2009). *Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability.*, 107(6), 0-. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.02.024>

Wei Zhang; Z. Li; B. Peng (2010). *Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material.*, 43(9), 769–774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01733.x>

Wittrant, Y., Gorin, Y., Woodruff, K., Horn, D., Abboud, H. E., Mohan, S., & Abboud-Werner, S. L. (2008). High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone*, 42(6), 1122–1130.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.02.006>

Xie, Z., Shen, Z., Zhan, P., Yang, J., Huang, Q., Huang, S., Chen, L., & Lin, Z. (2021). Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8991.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168991>

Zafar K, Jamal S, Ghafoor R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. *J Pak Med Assoc*. 2020 Mar;70(3):497-504. <https://doi.org/10.5455/JPMA.16942>

Zamparini F, Siboni F, Prati C, Taddei P, Gandolfi MG (2018) Properties of calcium silicate-monobasic calcium phosphate materials for endodontics containing tantalum pentoxide and zirconium oxide. *Clin Oral Investig* 23:445–457.
<https://doi.org/10.1007/s00784-018-2453-7>

Zanini, M., Meyer, E., & Simon, S. (2017). Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, 43(7), 1033–1051. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.02.009>

Zhan, C., Huang, M., Yang, X., & Hou, J. (2021). Dental nerves: a neglected mediator of pulpitis. *International Endodontic Journal*, 54(1), 85–99. <https://doi.org/10.1111/iej.13400>

Zhekov KI, Stefanova VP. Definition and Classification of Bioceramic Endodontic Sealers. *Folia Med (Plovdiv)*. 2021 Dec 31;63(6):901-904. <https://doi.org/10.3897/folmed.63.e58912>

Zhou, W., Zheng, Q., Tan, X., Song, D., Zhang, L., & Huang, D. (2017). Comparison of Mineral Trioxide Aggregate and iRoot BP Plus Root Repair Material as Root-end Filling Materials in Endodontic Microsurgery: A Prospective Randomized Controlled Study. *Journal of Endodontics*, 43(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.010>

Zhou Y, Wu C , Xiao Y . Silicate-based bioceramics for periodontal regeneration. *J Mater Chem B*. 2014 Jul 7;2(25):3907-3910. <https://doi.org/10.1039/c4tb00377b>

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antimicrobiana, imunomodulatória e anti-osteoclastogênica dos cimentos Bio C Repair, Bio C Repair Ion+ e MTA Repair HP.

Pesquisador: Taia Maria Berto Rezende

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61252922.7.0000.0029

Instituição Proponente: Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Patrocinador Principal: Universidade Católica de Brasília - UCB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.650.132

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa do Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Instituição Universidade Católica de Brasília a ser desenvolvido pela estudante de mestrado Larissa Barbosa de Sousa sob orientação da professora Taia Maria Berto Rezende.

RESUMO:

A polpa dentária é constituída por um tecido conjuntivo frouxo que possui diversas funções. O insucesso do tratamento endodôntico muitas vezes está relacionado a presença dos patógenos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* devido a sua alta resistência diante do tratamento. Em muitas situações de insucesso relacionado ao tratamento endodôntico convencional, é necessário o uso de agentes reparadores, como cimentos a base de Agregado de Trióxido Mineral (MTA). O objetivo deste estudo é investigar as atividades antimicrobianas, imunomodulatórias e anti-osteoclastogênica dos cimentos Bio C Repair e o Bio C Repair Ion+, em comparação com o MTA Repair HP. A atividade antimicrobiana será analisada pela avaliação da inibição do crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis*, além de avaliar a capacidade de erradicar biofilme dos mesmos microrganismos. A capacidade migratória e proliferativa destes cimentos será avaliada em culturas de células do ligamento periodontal humano (hPDLSCs). Nesta mesma cultura celular será avaliada a produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios. Por último, a atividade

Endereço: QS 07 Lote 01 EPCT - Bloco R, Sala 201
Bairro: Taguatinga **CEP:** 71.966-700
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)33563-9784 **Fax:** (61)33563-9636 **E-mail:** cep@ucb.br

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1993494.pdf	13/09/2022 18:04:02		Aceito
Outros	RESPOSTA_A_PENDENCIA_CEP_2022.pdf	13/09/2022 18:02:55	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final_pendencia.pdf	12/09/2022 20:00:02	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_final_pendencia.pdf	12/09/2022 19:58:46	Taia Maria Berto Rezende	Aceito

Endereço: QS 07 Lote 01 EPCT - Bloco R, Sala 201
 Bairro: Taguatinga CEP: 71.966-700
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)33563-9784 Fax: (61)33563-9636 E-mail: cep@ucb.br

Página 11 de 12



Continuação do Parecer: 5.650.132

Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_CEP_2022_Sueli.pdf	04/08/2022 14:01:39	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_CEP_2022_ERIC.pdf	04/08/2022 14:01:06	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_CEP_2022.pdf	04/08/2022 13:59:47	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	04/08/2022 13:53:51	Taia Maria Berto Rezende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASÍLIA, 18 de Setembro de 2022

Assinado por:
MARCELO HENRIQUE SOLLER RAMADA
 (Coordenador(a))

8.2 ANEXO B - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO NA REVISTA *BRAZILIAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES* (QUALIS B1 CAPES).

Dear author(s): Raquel Figuerêdo Ramos, Larissa Barbosa de Sousa, Taia Maria Berto Rezende, Paula Ribeiro Garcia
Thank you for submitting your manuscript "PBMFEU PROPERTIES OF BIOCERMIC MATERIALS FOR ENDODONTIC USE: A NARRATIVE REVIEW: Endodontic bioceramic material" to the Brazilian Journal of Oral Sciences.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication, and it will now be transferred to our production department. We will create a proof, which you will be asked to check, and you will also be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact you directly.

We appreciate you submitting your manuscript to Brazilian Journal of Oral Sciences and hope you will consider us again for future submissions.

Kind regards,
Altair A Del Bel Cury
Editor-in-Chief
Brazilian Journal of Oral Sciences

brjorals@unicamp.br

PROPERTIES OF BIOCERMIC MATERIALS FOR ENDODONTIC USE: A NARRATIVE REVIEW

Raquel Figuerêdo Ramos¹, Larissa Barbosa de Sousa¹, Paula Ribeiro Garcia^{2,3}, Taia Maria Berto Rezende^{1,2,4,5}

¹ Postgraduation in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil,...

² Postgraduation in Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, QS 07, lot 01, Bloco-G, room G106.A, Taguatinga Sul – Taguatinga, Brasília – DF, 71966-700, Brazil,...

³ Department of Dental Clinic, Federal University of Juiz de Fora, University Campus, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro, Juiz de Fora - MG, 36036-900 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Dentistry Department, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

⁵ Postgraduation in Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

Correspondence

Taia M. B. Rezende, Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília (UnB), Campus Univ. Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte- Brasília

Zip code: 70.910-900, DF- Brazil.

Phone: +55 61 98134-9001

E-mail: taiambr@gmail.com

Secondary e-mail: taia.rezende@unb.br

ORCID

Raquel Figueredo Ramos: 0009-0004-4942-2105

Larissa Barbosa de Sousa: 0000-0002-6280-2282

Paula Ribeiro Garcia: 0000-0001-8329-3141

Taia Maria Berto Rezende: 0000-0002-4148-0659

8.3 ANEXO C - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO NA REVISTA *BRAZILIAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES* (QUALIS B1 CAPES).

Dear author(s): Taia Maria Berto Rezende, Thaís Silva Soares, Larissa Barbosa de Sousa

Thank you for submitting your manuscript "KHPRDT Knowledge of Health Professionals Regarding Dental Trauma: Dental Trauma" to the Brazilian Journal of Oral Sciences.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication, and it will now be transferred to our production department. We will create a proof, which you will be asked to check, and you will also be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact you directly.

We appreciate you submitting your manuscript to Brazilian Journal of Oral Sciences and hope you will consider us again for future submissions.

Kind regards,
Altair A Del Bel Cury
Editor-in-Chief
Brazilian Journal of Oral Sciences

bjorals@unicamp.br

Knowledge of Health Professionals Regarding Dental Trauma

Thaís Silva Soares¹, Larissa Barbosa de Sousa², Taia Maria Berto Rezende^{2,3,4,5}

¹Graduation in Dentistry, Catholic University of Brasília, QS 07, lot 01, Bloco S, Taguatinga Sul, Brasília - DF, 71966-700, Brazil.

²Postgraduation in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

³Dentistry Department, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

⁴Postgraduation in Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, QS 07, lot 01, Bloco-G, room G106.A, Taguatinga Sul – Taguatinga, Brasília – DF, 71966-700, Brazil.

⁵Postgraduation in Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

The Scopus Author ID (ORCID number)

Thaís Silva Soares: <http://orcid.org/0009-0007-9360-731X>

Larissa Barbosa de Sousa: <http://orcid.org/0000-0002-6280-2282>

Taia Maria Berto Rezende: <http://orcid.org/0000-0002-4148-0659>

***Corresponding author data:**

Taia M. B. Rezende, Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia (UnB), Campus Univ. Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte- Brasília
Zip code: 70.910-900, DF- Brazil.

Phone : +55 61 981349001

Email: taiambr@gmail.com

Secondary e-mail: taia.rezende@unb.br

Phone : +55 61 981349001

8.4 ANEXO D - ARTIGO PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO COMO COLABORADORA NA REVISTA *JOURNAL OF ENDODONTICS* (QUALIS A1 CAPES).

Jade Omrondes de Farias, MD, DDS,* Maurício Gonçalves da Costa Sousa, PhD, MD, DDS,^{†‡§} Danilo César Mota Martins, MD, DDS,* Mayara Alves de Oliveira, DDS,* Isadora Takahashi, DDS,* Larissa Barbosa de Sousa, DDS,* Ingrid Gracielle Martins da Silva, MD, BSc,^{||} José Raimundo Corrêa, PhD, MD,^{||} Amanda Évelin Silva Carvalho, PhD, MD,[¶] Felipe Saldanha-Araújo, PhD, MD,[¶] and Taia Maria Berto Rezende, PhD, MD, DDS^{¶†††††}

SIGNIFICANCE

This study reveals that senescence in dental pulp cells causes morphological alterations, reduced cell function, and an exacerbated inflammatory and immunosuppressive response, potentially complicating conservative endodontic prognosis. Managing senescence is crucial for better treatment outcomes in endodontics.

From the *Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; [†]Division of Biomaterials and Biomechanics, Department of Restorative, Dentistry, School of Dentistry, Oregon Health & Science University, Portland Oregon; [‡]Knigh Cancer Precision Biotransformation Hub, Knigh Cancer Institute, Oregon, Health and Science University, Portland, Oregon; [§]Cancer Early Detection Advanced Research Center, Oregon Health Science University, Portland, Oregon; ^{||}Laboratório de Microscopia e Microanálise, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; [¶]Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^{¶†††††}Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica, de Brasília, Brasília, Brazil; ^{¶†††††}Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; and ^{¶†††††}Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

BASIC RESEARCH – BIOLOGY

Senescence on Dental Pulp Cells: Effects on Morphology, Migration, Proliferation, and Immune Response



ABSTRACT

Introduction: Evidence indicates that senescence can affect essential dental pulp functions, such as defense capacity and repair, consequently affecting the successes of conservative endodontic treatments. This study aims to evaluate the effects of senescence on the morphology, migration, proliferation, and immune response of human dental pulp cells. **Methods:** Cells were treated with doxorubicin to induce senescence, confirmed by β -galactosidase staining. Morphological changes, cellular proliferation, and migration were evaluated by scanning electron microscopy, trypan blue cells, and the scratch method, respectively. Modifications in the immune response were evaluated by measuring the genes for pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin (IL)-6 and anti-inflammatory cytokines transforming growth factor beta 1 and IL-10 using the real time polymerase chain reaction assay. **Results:** An increase in cell size and a decrease in the number of extensions were observed in senescent cells. A reduction in the proliferative and migratory capacity was also found in senescent cells. In addition, there was an increase in the gene expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and IL-6 and a decrease in the gene expression of IL-10 and transforming growth factor beta-1, suggesting an exacerbated inflammatory situation associated with immunosuppression. **Conclusions:** Cellular senescence is possibly a condition that affects prognoses of conservative endodontic treatments, as it affects primordial cellular functions related to this treatment. (*J Endod* 2024;50:362–369.)

KEY WORDS

Conservative endodontic treatments; pulp cells; senescence

Senescence is a cellular state characterized by the irreversible interruption of the cell cycle halting replication in the G1 phase and remaining alive and metabolically active¹. This state can be divided into replicative senescence, related to telomere shortening, and stress-induced senescence. Cellular senescence causes morphological alterations such as increased volume and irregular structure, and it is associated with changes in the cytoskeleton and vimentin filaments¹. Senescent cells also exhibit increased activity of lysosomes and enzyme SA- β -gal, as well as upregulated expression of genes such as p21, p16, and p53². This cellular state also results in metabolic reprogramming and the manifestation of secretory proteins, known as the senescence-associated secretory phenotype³. In general, this state contributes to aging, age-related diseases, and a decline in cellular functions⁴.

Senescence can also affect the immune system⁵. Immunosenescence refers to changes in the immune system during aging, leading to a progressive decline in immune functions and increased susceptibility to diseases⁶. This stage results from two complementary processes: the effects of cellular senescence on immune cells and the weakening of the body's barriers indirectly caused by tissue cellular senescence, which promotes the release of signaling molecules to which immune cells respond⁶. Senescence-associated secretory phenotype proteins compromise immune system functions, including the elimination of senescent