

RAQUEL FIGUERÊDO RAMOS

**CIMENTOS OBTURADORES BIOCERÂMICOS E CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL: EFEITOS ANTIMICROBIANOS, TOXICIDADE, MIGRAÇÃO E
RESPOSTA IMUNE**

BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL

2024

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

RAQUEL FIGUERÊDO RAMOS

**CIMENTOS OBTURADORES BIOCERÂMICOS E CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL: EFEITOS ANTIMICROBIANOS, TOXICIDADE, MIGRAÇÃO E
RESPOSTA IMUNE**

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

2024

RAQUEL FIGUERÊDO RAMOS

**CIMENTOS OBTURADORES BIOCERÂMICOS E CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL: EFEITOS ANTIMICROBIANOS, TOXICIDADE, MIGRAÇÃO E
RESPOSTA IMUNE**

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 13 de setembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende (Presidente)

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Francine Benetti Faria

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Jacy Ribeiro de Carvalho Junior

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Eliete Neves Da Silva Guerra (Suplente)

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho ao meu "Môzi", Filipe,
por todo amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por arquitetar todos os meus dias e por me assegurar da Sua constante companhia. "Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento." Provérbios 2:6;

Ao meu esposo, Filipe, por embarcar comigo nesta aventura. Você torna tudo mais leve, meu "Môzi". Obrigada por toda a compreensão, amor e carinho. Você foi essencial para a realização deste sonho. Este título também é seu. Eu te amo;

Ao meu papai, meu primeiro amor, João, que é meu exemplo especialmente em disciplina. Este título também é seu, papis. A ti, minha eterna gratidão. Eu te amo;

À minha mamãe, Vanda, que é meu exemplo de determinação e parceria. Ah, mamãe, como a senhora foi essencial neste processo. Obrigada pelas orações, pelo incentivo e por segurar firme a minha mão. Este título é seu!!! Sou eternamente grata a ti. Eu te amo;

Ao meu irmãozinho, André, pelos "cafezinhos de minas" quando o cansaço tomava conta, pelo incentivo e por estar sempre na torcida. Este título também é seu, irmão. Eu te amo;

Aos meus sogros, Levimar e Hosana, por todas as orações, apoio e palavras de carinho;

À minha orientadora, Profa. Dra. Taia, pelo constante incentivo, pelas valiosas orientações e pela confiança. Agradeço pela generosidade e pela palavra amiga quando precisei. Seus conselhos e correções foram essenciais para o desenvolvimento e aprimoramento da minha formação;

À minha prima Beatriz e à minha amiga Daniela, por todo carinho e amor, e por torcerem verdadeiramente pelas minhas vitórias;

Ao meu grande amigo Johnny, por todas as contagens de células, madrugadas adentro, e pela paciência nos ajustes das minhas figuras. Vou guardar para sempre essa generosidade. Agradeço pelos lanches, cinemas e por me receber com tanto carinho em sua casa quando precisávamos esfriar a cabeça. Sou eternamente grata pela sua amizade;

À minha grande amiga Maria Ester, pelos incontáveis dentes coletados aos sábados e por ser uma excelente aluna de IC. Muito obrigada por toda a parceria, conselhos, incentivo, broncas, risadas fáceis e doce de leite. Sou eternamente grata pela sua amizade;

À Larissa, por toda a ajuda que me deu quando entrei no grupo Biodonto. Obrigada pelos ótimos momentos que passamos juntas no Biscoito Mineiro e pelos conselhos. Você foi essencial neste processo;

À Mayara, pelos socorros com os reagentes durante meus experimentos e pelas boas conversas;

Ao Francisco, por toda a receptividade, ensinamentos, boas risadas e generosidade;

À Ana Angélica, pelos dentes e risadas aos sábados;

À Júlia, pelo auxílio nas infinitas escalas e aos demais integrantes do grupo Biodonto;

À Rosiane, por todo o carinho no laboratório e pela contribuição essencial no experimento do MALDI;

Ao Samuel, por toda a paciência, acolhimento e ensinamento no laboratório;

À Poliana, por todo o carinho e orientação quando precisei;

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;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e toda estrutura da Universidade de Brasília, pela oportunidade;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, da Universidade Católica de Brasília, pelo acolhimento e estrutura;

À CAPES, CNPq, FAPDF, UCB e UnB, pelo auxílio financeiro;

Meus sinceros agradecimentos!

*"Mas graças a Deus, que nos dá a vitória por
meio de nosso Senhor Jesus Cristo."*

1 Coríntios 15:57

RESUMO

Os cimentos obturadores biocerâmicos auxiliam no sepultamento de microrganismos selando os túbulos dentinários e isolando a comunicação entre o canal radicular e o espaço perirradicular. No entanto, por serem cimentos recém-lançados, existem poucas informações sobre os efeitos biológicos dos cimentos Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon +, assim como seu desempenho ao longo do tempo, especialmente em relação à interação com os tecidos periodontais. Ademais, estes materiais demonstram bioatividade nos tecidos perirradiculares. Desta forma, este estudo avaliou o potencial antimicrobiano, citotóxico, proliferativo, migratório e resposta imunomodulatória dos extratos dos cimentos biocerâmicos Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + e do cimento resinoso AH Plus, em cultura primária de células do ligamento periodontal humano (hPDLSC) e em microrganismos. Inicialmente, a atividade antimicrobiana dos extratos dos cimentos foi verificada através da avaliação da concentração inibitória mínima do crescimento de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Na sequência, a toxicidade dos extratos dos cimentos foi verificada em cultura de hPDLSC pelo ensaio de MTT. Em seguida, análise do efeito proliferativo e migratório destes cimentos foi avaliada pelo ensaio de *Scratch* em cultura de hPDLSC. Por fim, foi avaliado o efeito dos cimentos na expressão gênica por PCR, das citocinas pró-inflamatórias *fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)* e *interleucina (IL)-1 β* e *IL-6* e da citocina regulatória *IL-10*, em diferentes situações experimentais. Resultados demonstraram que o AH Plus e Bio-C Sealer íon + inibiram 100% do crescimento de *E. faecalis* na presença de extratos (1:1, 1:2 e 1:4). No entanto, somente os extratos 1:1 de AH Plus, Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + inibiram 100% do crescimento de *C. albicans*. A toxicidade dos cimentos foi demonstrada de forma dose dependente nas culturas de hPDLSC, de maneira que os menores percentuais de viabilidade foram observados na presença dos extratos não diluídos de AH Plus (55%), Bio-C Sealer (69%) e Bio-C Sealer íon + (72%) ($p < 0,0001$). No ensaio de *Scratch*, observou-se que o extrato do cimento Bio-C Sealer íon + (1:4) ($p < 0,0001$) permitiu a maior taxa de migração e proliferação celular após 48h, em comparação com os dados dos cimentos AH Plus e Bio-C Sealer. Por fim, observou-se que o AH Plus elevou a expressão gênica das citocinas *TNF- α* , *IL-6* e *IL-10* em todas as condições testadas. Também foi observado um aumento na expressão de *IL-1 β* em comparação com o selante Bio-C. De forma oposta, os cimentos Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + não

afetaram a expressão gênica de *TNF- α* , *IL-6*, *IL-10* e *IL-1 β* em todas as condições. Dessa forma, conclui-se que, em comparação com os outros cimentos testados, o Bio-C Sealer íon + proporcionou maior viabilidade, proliferação e migração celular, além de apresentar uma ação antimicrobiana eficaz, sem induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: Antimicrobiana, biocerâmicos, biocompatibilidade, toxicidade, bioatividade.

ABSTRACT

Bioceramic sealers help to bury microorganisms by sealing the dentinal tubules and isolating the communication between the root canal and the periradicular space. However, as they are newly launched sealers, there is little information about the biological effects of Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + sealers, as well as their performance over time, especially in relation to the interaction with periodontal tissues. Furthermore, these materials demonstrate bioactivity in periradicular tissues. Therefore, this study evaluated the antimicrobial, cytotoxic, proliferative, migratory and immunomodulatory potential of extracts of the bioceramic sealers Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + and the resin cement AH Plus, in primary culture of human periodontal ligament cells (hPDLSC) and in microorganisms. Initially, the antimicrobial activity of the cement extracts was verified by evaluating the minimum inhibitory concentration for the growth of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Subsequently, the toxicity of the cement extracts was verified in hPDLSC culture by the MTT assay. Then, the proliferative and migratory effects of these cements were evaluated by the Scratch assay in hPDLSC culture. Finally, the effect of the cements on gene expression by PCR, of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (*TNF- α*) and interleukin (*IL*)-1 β and *IL*-6 and of the regulatory cytokine *IL*-10, in different experimental situations, was evaluated. The results demonstrated that AH Plus and Bio-C Sealer íon + inhibited 100% of the growth of *E. faecalis* in the presence of extracts (1:1, 1:2 and 1:4). However, only the 1:1 extracts of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + inhibited 100% of the growth of *C. albicans*. The toxicity of the sealers was demonstrated in a dose-dependent manner in the hPDLSC cultures, so that the lowest viability percentages were observed in the presence of the undiluted extracts of AH Plus (55%), Bio-C Sealer (69%) and Bio-C Sealer íon + (72%) ($p < 0.0001$). In the Scratch assay, it was observed that the extract of the Bio-C Sealer íon + sealer (1:4) ($p < 0.0001$) allowed the highest rate of cell migration and proliferation after 48h, compared to the data of the AH Plus and Bio-C Sealer sealers. Finally, it was observed that AH Plus increased the gene expression of the cytokines *TNF- α* , *IL*-6 and *IL*-10 in all conditions tested. An increase in the expression of *IL*-1 β was also observed compared to the Bio-C sealant. Conversely, the Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + cements did not affect the gene expression of *TNF- α* , *IL*-6, *IL*-10 and *IL*-1 β in all conditions. Thus, it is concluded that, compared to the other cements tested,

the Bio-C Sealer íon + provided greater viability, proliferation and cell migration, in addition to presenting an effective antimicrobial action, without inducing the expression of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: antimicrobials, bioceramics, biocompatibility, toxicity, bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figuras da Dissertação:

Figura 1 – Fluxograma representativo das fases da pesquisa.

Figuras do Manuscrito:

Figure 1. hPDLSC viability by MTT assay. hPDLSC viability after 24 h of incubation with AH Plus (A), Bio-C Sealer (B) and Bio-C Sealer íon + (C) extracts (1:1, 1:2 and 1:4). Graphs represent the mean and standard deviation of the absorbance and percentage of cell viability of three biological replicates performed in technical triplicates. ** $p=0.002$; *** $p=0.0001$ and **** $p<0.0001$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test.

Figure 2. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + extracts (1:1), after 24 and 48 h. (A) Percentage of cells migrated to the wound in 24 h and 48 h. * $p < 0.05$ and ** $p=0.002$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + extract (1:1). (C) Representative image of the cell migration test, using the scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.

Figure 3. *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-10* genes expression. By hPDLSC. Cells when exposed to AH Plus (1:1), Bio-C Sealer (1:1) and Bio-C Sealer íon + (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 FN- γ (C, F, I and L) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), after 24 h of incubation. Graphs represent mean and standard deviation of three biological replicates in technical triplicate. For analysis of *TNF- α* and *IL-1 β* expression, the CT of samples that did not show

amplification was set at 40. * $p < 0.05$, ** $p = 0.002$, *** $p = 0.0001$ and **** $p < 0.0001$ represent statistical difference verified by two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

Supplementary Figure 1. MALDI-ToF (matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight) of pure extract from AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion +. (A) matrix, (B) AH Plus extract (1:1), (C) Bio-C Sealer (1:1), (D) Bio-C Sealer ion + (1:1).

Supplementary Figure 2. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to AH Plus cement (1:1, 1:2 and 1:4), after 24 and 48 h. (A) Percentage of cells migrated to the wound at 24 h and 48 h. ** $p = 0.002$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of AH Plus in the extracts (1:1, 1:2 and 1:4). (C) Representative image of the cell migration test, using the scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.

Supplementary Figure 3. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to Bio-C Sealer cement in extracts (1:1, 1:2 and 1:4), after 24 and 48 h. (A) Percentage of cells migrated to the wound at 24 h and 48 h. * $p < 0.05$ and ** $p = 0.002$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of Bio-C Sealer in the extracts (1:1, 1:2 and 1:4). (C) Representative image of the cell migration test, using the scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.

Supplementary Figure 4. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to Bio-C Sealer ion + cement (1:1, 1:2 and 1:4). (A) Percentage of cells migrated to the wound at 24 h and 48 h. * $p < 0.05$, ** $p = 0.002$ and **** $p < 0.0001$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of Bio-C Sealer ion + in the extracts (1:1, 1:2 and 1:4). Statistical differences verified by Student's t-test * $p < 0.05$. (C) Representative image of the cell migration test, using the

scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.

LISTA DE TABELAS

Tabela da dissertação:

Tabela 1: Sequência de *primers* para cada gene usado no ensaio de PCR.

Tabelas do Manuscrito:

Table 1: Sequence of primers for each gene used in the PCR assay.

Table 2. Growth inhibition of *E. faecalis* e *C. albicans* in the presence of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon +. Positive control was represented by Ampicillin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and Amphotericin B 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. pH of each sealer extract was demonstrated. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) are represented by Detected (D) and Not Detected ND. Non-detected MIC was followed by percentage of microorganism inhibition between parentheses.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI - *brain heart infusion* (infusão de cérebro e coração)

CO₂ – dióxido de carbono

DMEM - *meio eagle modificado por dulbecco*

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

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

hDPCs - *human dental pulp cells* (células da polpa dental humana)

IFN- γ - interferon gama

IL – interleucina

ISO - organização internacional de standardização

LPS – lipopolissacarídeo

MALDI - *matrix-assisted laser desorption/ionization* (ionização e dessorção a laser assistida por matriz)

MIC - concentração inibitória mínima

MBC – concentração bactericida mínima

MFC- concentração fungicida mínima

MTA – agregado de trióxido mineral

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PCR - *polimerase chain reaction* (reação de polimerização em cadeia)

RNA - Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SFB – soro fetal bovino

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1. PREFÁCIO.....	19
INTRODUÇÃO.....	20
2.1. Fatores associados ao insucesso endodôntico.....	20
2.2. Cimentos Endodônticos.....	22
2.3. Cimentos Biocerâmicos.....	24
2.4. Cimentos obturadores Biocerâmicos.....	28
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo Geral.....	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
4. MÉTODOS.....	33
4.1. Delineamento Experimental.....	33
4.1.2. Preparação dos Cimentos.....	33
4.1.3. Efeito dos cimentos AH Plus, Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + na atividade antimicrobiana.....	34
4.1.4. Cultura primária de hPDLSC.....	35
4.1.5. Efeito do Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + e AH Plus na viabilidade de hPDLSC.....	35
4.1.6 Efeito do AH Plus, Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + na migração e proliferação de hPDLSC.....	36
4.1.7 Efeito de AH Plus, Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + na expressão do gene da citocina.....	36
4.1.8 Análises estatísticas.....	37
5. CAPÍTULO 1 - Manuscrito.....	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
7. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E MÉTODOS)	65
8. ANEXOS.....	70

PREFÁCIO

A endodontia, como especialidade odontológica, tem avançado significativamente nas últimas décadas, impulsionada por inovações tecnológicas e pelo desenvolvimento de novos materiais. Dentro deste contexto, o tratamento endodôntico se estabeleceu como uma das práticas mais importantes para a preservação dos dentes naturais, contribuindo para a saúde bucal e, conseqüentemente, para a qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, o sucesso desse tipo de tratamento depende de múltiplos fatores, entre eles, a eliminação eficaz de microrganismos presentes no sistema de canais radiculares e a utilização de cimentos endodônticos que garantam uma vedação adequada e sejam biocompatíveis com os tecidos perirradiculares.

O objetivo deste estudo é aprofundar o conhecimento sobre as propriedades antimicrobianas e de biocompatibilidade dos cimentos endodônticos mais modernos, com ênfase nos cimentos biocerâmicos, que representam a vanguarda no desenvolvimento de materiais endodônticos. Através de uma análise comparativa entre Bio-C Sealer (Angelus, Londrina, Brasil), Bio-C Sealer íon + (Angelus, Londrina, Brasil) e o tradicional AH Plus (Dentsply/De Trey GmbH, Konstanz, Alemanha), este trabalho busca oferecer uma compreensão mais ampla sobre como esses cimentos interagem com células do ligamento periodontal humano (hPDLSC) e como podem influenciar no processo de cicatrização após o tratamento endodôntico.

Para tanto, esta dissertação de mestrado foi estruturada no formato em capítulos, contendo: Introdução, Objetivos, Materiais e métodos, Capítulos, Considerações finais, Referências e anexos. No capítulo 1 “manuscrito”, encontra-se o artigo preparado com os resultados desta dissertação, formatado com as normas da *International Endodontic Journal* (IF: 5.4, A1 CAPES), periódico para o qual pretendemos submeter este trabalho. Nos anexos, encontram-se: a aprovação no comitê de ética em pesquisa, demais artigos aceitos e em preparação durante o mestrado.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Fatores associados ao insucesso endodôntico

O tratamento endodôntico tem entre seus objetivos, a redução da carga e virulência microbiana do interior dos canais radiculares e suas ramificações, a fim de dar condições ao sistema imune do paciente para desenvolver mecanismos de reparo (Tabassumkhan *et al.*, 2016). O preparo químico-mecânico e o uso de medicações intracanaís reduzem significativamente o número de microrganismos no interior dos canais radiculares, no entanto, é quase impossível sua completa eliminação (Kapralos *et al.*, 2018).

Os fatores mais frequentemente associados ao insucesso do tratamento endodôntico, relacionados à persistência de microrganismos são o deficiente preparo químico-mecânico e o preenchimento inadequado do sistema de canais radiculares (Tabassumkhan *et al.*, 2016). Em alguns casos, o inadequado selamento ápico-coronal é responsável por levar fluidos teciduais para o canal radicular, fornecendo substrato aos microrganismos remanescentes, que podem proliferar e atingir número suficiente para gerar ou perpetuar uma lesão perirradicular. Por outro lado, existem situações em que os canais radiculares selados podem ser contaminados a partir da cavidade oral: infiltrações através de materiais de restauração temporária ou permanente; fratura ou perda da restauração; fratura da estrutura dentária; cavidades recorrentes que expõem o material obturador radicular; ou atraso na aplicação do material restaurador definitivo. Nestas circunstâncias, se a obturação radicular não impedir a percolação da saliva, os microrganismos podem invadir e recolonizar o sistema de canais radiculares (Siqueira *et al.*, 1999; Prada, 2019).

Os casos de tratamento endodôntico aparentemente bem realizado que resultam em insucesso, têm sido associados a fatores microbianos persistentes que causam infecção intraradicular ou extra radicular e que se tornam resistentes às medidas de desinfecção (Prada *et al.*, 2019). Fatores como a existência de interações microbianas, a expressão de fatores de virulência em número suficiente para causar lesão perirradicular, a localização estratégica dos microrganismos no canal radicular,

o microambiente endodôntico favorável, as defesas do hospedeiro que, ao mesmo tempo tentam conter a infecção, acabam por produzir dano tecidual associado à lesão perirradicular, favorecem a persistência de infecção (Viapiana *et al.*, 2016).

A persistência de microrganismos em um conduto selado está atrelada à resistência dos mesmos às medidas de desinfecção intracanal e a sua adaptação a um ambiente com pouca disponibilidade de nutrientes. Portanto, apenas as poucas espécies que possuem essas habilidades podem estar envolvidas no fracasso do tratamento endodôntico. Além disso, bactérias localizadas em áreas como deltas apicais, istmos, canais laterais, irregularidades e túbulos dentinários podem muitas vezes escapar dos procedimentos de desinfecção endodôntica e é provável que o suprimento de nutrientes bacterianos permaneça inalterado após o tratamento. Por outro lado, os microrganismos não serão capazes de sobreviver se o substrato for drasticamente reduzido ou se a obturação não permitir o acesso aos tecidos perirradiculares. No entanto, as espécies microbianas resistentes sobreviverão por períodos relativamente longos, obtendo nutrientes a partir de restos de tecidos e células mortas. Além disso, se a obturação radicular não proporcionar um bom vedamento, a microfiltração dos fluidos teciduais pode fornecer um substrato para o crescimento bacteriano. A capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis é uma característica importante para as bactérias, pois frequentemente passam por períodos de escassez de nutrientes (Siqueira *et al.*, 2001).

Dentre os vários microrganismos presentes nas infecções de origem endodôntica, a *Candida albicans* e o *Enterococcus faecalis* são patógenos comumente relacionados o insucesso da terapia endodôntica (Jhajhariaj *et al.*, 2015). Esses microrganismos podem invadir profundamente os túbulos dentinários, os quais lhe permitem sobreviver à ação dos instrumentos, irrigantes e medicamentos utilizados durante o tratamento endodôntico (Alshwaimi *et al.*, 2016). Diante do exposto, na etapa da obturação o cimento de escolha deve apresentar propriedades que contribuam para um prognóstico favorável.

2.2 Cimentos Endodônticos

A obturação radicular é o procedimento clínico que sucede o preparo do canal radicular. Na escolha do melhor momento para a obturação, alguns pontos devem ser considerados, como ausência de sinais e sintomas e ausência de exsudação, denotando que durante a eliminação dos microrganismos do sistema de canais radiculares (SCR) a carga e a virulência microbiana foram diminuídas (Sanz *et al.*, 2019). A obturação é realizada com cones de guta percha e cimento obturador, que atuam na prevenção de uma subsequente infecção (Miranda *et al.*, 2013). A obturação radicular promove o sepultamento de microrganismos que porventura tenham sobrevivido ao preparo do canal, o selamento dos túbulos dentinários e o isolamento da comunicação entre o canal radicular com o espaço perirradicular (Abu *et al.*, 2022).

Neste contexto, o cimento obturador deve promover um selamento adequado. Características como boa adesão às paredes do canal, facilidade de manipulação e de remoção do canal radicular, radiopacidade e estabilidade da coloração do elemento dentário também são apontadas como características esperadas em um cimento obturador (Kapralos *et al.*, 2018). Além de promover um selamento adequado, o cimento endodôntico deve apresentar importante função no controle da infecção, uma vez que são os responsáveis por sepultar as bactérias residuais nos túbulos dentinários e prevenir a entrada de fluidos ou novas bactérias nos canais radiculares (Kapralos *et al.*, 2018). A escolha de um cimento endodôntico com substancial atividade antimicrobiana pode ser coadjuvante na inibição da proliferação dos microrganismos remanescentes em casos de necrose pulpar e periodontite apical (Kapralos *et al.*, 2018).

Outra característica de um cimento ideal é ser biocompatível, pois podem interagir com os tecidos periodontais, não apenas em situações de extravasamento na região perirradicular (Sanz *et al.*, 2020). O extravasamento desse material pode gerar uma reação do tipo corpo estranho, resultando em inflamação dos tecidos periapicais e até necrose (Pascon *et al.*, 1991). É importante enfatizar que o comprometimento ou a inflamação crônica na região periapical podem estar relacionados com o tipo de material extravasado e sua quantidade (Nair, 2006).

Até meados de 1990, os cimentos endodônticos foram didaticamente classificados em cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, ionômero de vidro e resina epóxi (Viapiana *et al.*, 2016). No entanto, a grande maioria destes cimentos apresentavam reação tecidual quando em contato com os tecidos perirradiculares. Um exemplo, são os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol que apresentam uma maior reação inflamatória em comparação com os demais cimentos (Alves *et al.*, 2020). Em contrapartida, desde 1972, os cimentos obturadores a base de hidróxido de cálcio foram utilizados. Estes representavam os cimentos com maior biocompatibilidade tecidual. No entanto, esse material apresenta baixa solubilidade, não apresentam radiopacidade suficiente, pouca fluidez, baixa viscosidade, não aderem à dentina e são permeáveis (Bueno, 2013; Huang *et al.*, 2018).

Assim, os cimentos a base de resina epóxi, surgiram no mercado apresentando boa capacidade de escoamento e selamento apical, alta radiopacidade, boa resistência de união à dentina, boa biocompatibilidade, baixa solubilidade, estabilidade de cor e fácil remoção (Vertuan *et al.*, 2017; Viapiana *et al.*, 2016). O cimento AH plus (Dentsply) é um cimento composto por resina epóxi, possui um sistema de duas pastas, agente de presa e partículas de carga, que além de reduzir o tempo de endurecimento, proporcionam melhor adesão às paredes do canal. Apresenta boa fluidez, bom selamento e maior tempo de trabalho. Entre os cimentos à base de resina, o AH Plus (Dentsply) é um dos cimentos mais usados e confiáveis na prática endodôntica (Resende *et al.*, 2009; Kapralos *et al.*, 2018), sendo considerado na atualidade o padrão ouro (Kapralos *et al.*, 2018).

Além das características citadas acima, em 2022, Ashraf e colaboradores observaram no estudo *in vivo* uma boa biocompatibilidade do cimento AH Plus (Dentsply) quando comparado aos cimentos Resil (instituto de ciência e tecnologia de cores, Teerã, Irã) e H26 (Dentsply, De Trey, Konstanz, Alemanha). Neste estudo doze ratos foram avaliados. Quatro tubos de polietileno contendo os cimentos Resil, AH Plus (Dentsply), AH26 (Dentsply) e um tubo vazio foram implantados por via subcutânea em ratos. O grau de inflamação, o tipo de células inflamatórias presentes, a reação de corpo estranho, a qualidade do tecido conjuntivo e a presença de cápsula fibrótica foram avaliados histopatologicamente após a implantação dos tubos para

avaliação da biocompatibilidade. Os dados foram analisados pelo teste Qui-quadrado. Aos 7 dias, o grau de inflamação no grupo Resil foi quase semelhante ao grupo AH26 (Dentsply), e 66,7% dos ratos apresentaram inflamação moderada. O grupo AH Plus (Dentsply) apresentou menos inflamação comparado aos outros cimentos (Ashraf *et al.*, 2022).

Outra característica deste cimento é sua ação antimicrobiana. Em 2018, Kapralos e demais, na realização de um estudo *in vitro*, investigaram a atividade antibacteriana e dois cimentos endodônticos contra bactérias planctônicas cultivadas em biofilmes. A atividade antibacteriana dos cimentos AH Plus (Dentsply) e TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça) foi investigada para biofilmes planctônicos de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. O AH Plus (Dentsply) apresentou alta atividade antibacteriana contra todas as espécies investigadas, tanto planctônicas quanto em biofilmes quando comparado ao TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA) (Kapralos *et al.*, 2018).

Apesar do cimento obturador com propriedade seladora radicular à base de resina ser o material mais comumente usado, a falta de adesão química entre a estrutura dentária e o cimento do canal radicular torna-se desafiador (Santos *et al.*, 2021). Desta forma, há uma solicitação contínua por novos biomateriais que sejam capazes de aderir à parede do canal radicular, como os cimentos biocerâmicos.

2.3 Cimentos Biocerâmicos

A introdução dos materiais obturadores biocerâmicos, como uma nova proposta, pode ser considerada como um dos avanços mais importantes na odontologia reparadora (Iftikhar *et al.*, 2021). Esta classe de cimentos é melhor denominada como hidráulicos, por ser o único grupo de cimentos que inicia sua reação de presa a partir do contato com a umidade presente no sistema de canais radiculares (Camilleri., 2016). Esses materiais apresentam excelentes propriedades de biocompatibilidade devido à sua semelhança com a hidroxiapatita biológica e produz, durante o processo de hidratação, diferentes compostos, como hidroxiapatitas, com

capacidade indutora de resposta regenerativa. Quando em contato com o tecido ósseo, a hidroxiapatita mineral tem efeito osteocondutor. Além de favorecer a formação de hidroxiapatita, possui características antibacterianas, biocompatíveis e radiopacas (Jitaru *et al.*, 2016).

Em 1990, os cimentos bioativos foram introduzidos no campo da endodontia, recebendo a denominação de biocerâmicos e representando um novo grupo de materiais dentários (Iftikhar *et al.*, 2021). O agregado de trióxido mineral (MTA) foi o primeiro membro da família dos silicatos de cálcio a ser inserido no contexto endodôntico (Camilleri, 2008). Atualmente, existe um grande interesse no desenvolvimento de materiais dentários bioativos que possam interagir e induzir a regeneração do tecido circundante, sendo o MTA o material mais estudado até o momento (Camilleri, 2008).

O MTA foi desenvolvido com base no cimento Portland e apresentando boas características, como biocompatibilidade e capacidade de vedamento (Parirokh *et al.*, 2010). O MTA foi inicialmente indicado para uso como material selador e retrobturador de perfurações radiculares, seguido de sua indicação como material de capeamento pulpar direto e apicificação. Em 1999, foi lançado o cimento ProRoot MTA (Dentsply/De Trey GmbH, Konstanz, Alemanha), o primeiro produto comercial. Esse cimento apresentava-se na cor cinza e serviu como base para outros produtos serem lançados no mercado. As limitações inerentes ao MTA incluíam o tempo de presa prolongado, alto custo e possibilidade de descoloração (Torabinejad *et al.*, 2010).

Em 2001, pensando na melhor operabilidade clínica, a empresa Angelus lançou o MTA Angelus, com menor tempo de presa, em virtude da remoção do sulfato de cálcio da composição do MTA tradicional (Bronzel *et al.*, 2018). No ano seguinte, a mesma empresa lançou o White MTA (Angelus), com menores concentrações de óxidos de ferro, alumínio, magnésio e óxido de bismuto. Esses cimentos foram classificados como Biocerâmicos de primeira geração (Bronzel *et al.*, 2018).

Mais tarde, surgem os cimentos biocerâmicos de segunda geração, que se destacam por apresentarem melhor bioatividade, menor solubilidade e fácil manipulação. Esses cimentos possuem propriedades biológicas compatíveis com o MTA, incluindo atividade antibacteriana, baixa citotoxicidade e uma resposta inflamatória reduzida. (Jerez-Olate *et al.*, 2021). A título de exemplo, em 2009, o

cimento Biodentine (BioRoot RCS; Septodont, Saint Maur Des Fosses, France) foi introduzido no mercado odontológico como um substituto da dentina em virtude da possibilidade de penetração nos túbulos dentinários. Esse cimento é desenvolvido à base de MTA e apresenta rápida solidificação (Kaur *et al.*, 2018). Além das características já citadas, em 2015, Kim e colaboradores observaram que o Biodentine apresentou maior deposição mineral em comparação ao ProRoot MTA (Dentsply), em um estudo *in vitro*. Esse trabalho avaliou a ocorrência de deposição mineral na interface entre a dentina e os cimentos em fluido corporal simulado em dentes extraídos. Em seguida, foram instrumentados com brocas Gates-Glidden, preenchidos com cimento e examinados com Microscópio Eletrônico de Varredura. Foi observado na camada interfacial de ambos os biomateriais, uma deposição mineral, sendo no Biodentine (Septodont) a mais espessa (Kim *et al.*, 2015).

Outro cimento de segunda geração é o MTA Repair HP (Angelus, Londrina, Brasil). Trata-se de um cimento reparador endodôntico de alta plasticidade constituído por óxidos minerais na forma de finas partículas hidrofílicas. Sua fórmula mantém todas as características químicas e biológicas da preparação original do MTA, como sua biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e atividade antibacteriana. Em 2021, Silva e colaboradores observaram em um estudo *in vitro* a redução do biofilme jovem e maduro de *S. mutans* na presença dos extratos diluídos (1:1, 1:2 e 1:4) do cimento MTA Repair HP (Angelus) (Silva *et al.*, 2021).

Depois do surgimento dos cimentos de reparo biocerâmicos, as indústrias lançaram os cimentos obturadores a base de biocerâmicos. Esses materiais apresentam importantes propriedades, físicas, químicas, biológicas, além da atividade antimicrobianas e sua capacidade de selamento e estabilidade dimensional (Viapiana *et al.*, 2016). A título de exemplo, o cimento BioRoot RCS (BioRoot RCS; Septodont, Saint Maur Des Fosses, France) foi lançado seguindo o mesmo componente ativo do MTA. Ele possui propriedades antimicrobianas, é biocompatível e bioativo. Além de apresentar um bom vedamento, em 2018, Urban e colaboradores observaram que o pH do cimento BioRoot RCS (Septodont) apresentou valores mais elevados, quando comparado aos cimentos MTA Fillapex (Angelus) e AH Plus (Dentsply), durante um longo período de tempo (Urban *et al.*, 2018).

Por fim, surgiram os Biocerâmicos de terceira geração, como o EndoSequence (Brasseler USA). Esse cimento contém duas formulações: massa (BC Putty) e pasta (BC Sealer). É um material hidrofílico de silicato de cálcio que forma hidroxiapatita após solidificação e pertence a classe dos biocerâmicos prontos para uso. Este produto apresenta bom desempenho operacional e segundo o estudo de Eren e colaboradores em 2022, apresenta baixo risco de descoloração dentária. Nesse estudo, os autores investigaram a estabilidade de cor, solubilidade e características superficiais comparados aos cimentos ProRoot MTA (Dentsply) e Biodentine (Septodont), após imersão em diferentes soluções. Esses cimentos foram colocados em moldes cilíndricos e cada amostra foi imersa em água destilada, hipoclorito de sódio, clorexidina ou cloridrato de octenidina por 24 horas. Ao final, os cimentos Biodentine (Septodont) e EndoSequence (Brasseler USA) apresentaram resultados promissores como alternativas adequadas ao ProRoot MTA (Dentsply), por não apresentarem descoloração (Eren *et al.*, 2022).

Além do EndoSequence (Brasseler USA) como cimento obturador, na mesma categoria encontra-se o TotalFill BC (FKG Dentaire). Destaca-se por também oferecer melhor estabilidade de cor e características de manuseio, ao mesmo tempo em que exibem propriedades físicas e químicas comparáveis ao MTA. Além disso, libera íons cálcio e fosfato essenciais para a deposição de hidroxiapatita e atividade antimicrobiana. Em 2020, Simundic e colaboradores compararam o cimento AH Plus (Dentsply) com o TotalFill BC (FKG Dentaire) no ensaio antimicrobiano e concluíram que o biocerâmico TotalFill BC (FKG Dentaire) tinha eficácia antimicrobiana semelhante ao AH Plus (Dentsply) e eficácia superior ao MTA Fillapex (Angelus) (Simundic *et al.* 2020). Em 2024, Raman e Camilleri, analisaram o cimento TotalFill BC (FKG Dentaire) com o AH Plus Bioceramic (Dentsply) através de um estudo *in vitro* e comprovaram que o Totalfill BC (FKG Dentaire) apresentou maior liberação de cálcio comparado ao AH Plus Bioceramic (Dentsply) (Raman e Camilleri., 2024). Ademais, ainda como produto de obturação, há os cimentos Bio-C Sealer (Angelus) e Bio-C Sealer íon + (Angelus). Abordaremos no tópico seguinte suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Além dos cimentos obturadores, uma indústria brasileira também lançou uma medicação intra-canal a base de Biocerâmicos. O BIO-C TEMP (Angelus) contém

silicato de cálcio em sua composição e foi o primeiro produto biocerâmico lançado como medicação intracanal. Em um estudo *in vitro*, o BIO-C TEMP (Angelus) demonstrou não ser citotóxico e levou à atividade osteogênica em células da linhagem osteoblástica humana (SaOs-2) quando comparado ao UltraCal®XS (Ultradent) (Guerreiro *et al.*, 2021).

2.4 Cimentos obturadores biocerâmicos

Por efeito de suas excelentes propriedades, diversos produtos Biocerâmicos estão surgindo no mercado (Pawar *et al.*, 2016), tal como, o cimento obturado Bio-C Sealer (Angelus) e de acordo com a empresa, a sua eficácia é resultado da formação de silicato de cálcio hidratado e liberação de íons cálcio, que estimulam a formação de tecido mineralizado (Tolosa-Monfà *et al.*, 2023). Essa capacidade é denominada bioatividade (Okamura *et al.*, 2020) que proporciona uma regeneração tecidual mais rápida. Porém, uma nova versão Bio-C Sealer íon + (Angelus) foi lançada e de acordo com o fabricante, promete maior liberação de íons cálcio, magnésio e silano, garantindo melhorias em suas propriedades quando comparado ao seu antecessor. Além de serem a base de silicatos de cálcio, são apresentados na forma de pasta pronta para ser injetada no interior dos canais radiculares, dispensando a manipulação e otimizando tempo clínico e evitando desperdício (Sanz *et al.*, 2020).

Essa liberação de íons de cálcio desses cimentos obturadores tem grande importância, pois promove uma forte ligação química e aumenta a bioatividade através da precipitação da camada semelhante à apatita com a parede da dentina (Zhang *et al.*, 2009). Sanz, em 2021, através de um estudo *in vitro* com células do ligamento periodontal avaliou a liberação de íons e potencial de mineralização na presença dos cimentos Bio-C Sealer íon + (Angelus), EndoSequence BC (Brasseler, Savannah, EUA) e AH Plus (Dentsply). A composição iônica foi avaliada por espectroscopia de energia dispersiva, já o potencial de mineralização pela coloração *Alizarin Red*. Os cimentos Bio-C Sealer íon + (Angelus) juntamente com o EndoSequence (Brasseler)

exibiram alta liberação de íons cálcio e aumento da formação de nódulos mineralizados quando em contato com as células (Sanz., 2021).

Em 2020, outro estudo analisando a bioatividade do cimento Bio-C Sealer (Angelus) em comparação com AH Plus (Dentsply) foi o do autor Silva e colaboradores. O estudo *in vivo* realizado através de implantação de tubos de polietileno preenchidos com o cimento em tecido subcutâneo de ratos, resultou em marcações positivas para osteocalcina. Mais uma vez o cimento Bio-C Sealer (Angelus) apresentou um bom potencial bioativo (Silva *et al.*, 2020).

Além de todas as características já citadas, os cimentos Bio-C Sealer (Angelus) e Bio-C Sealer íon + (Angelus) também apresentam ação antibacteriana e bacteriostática devido à alta alcalinidade e capacidade seladora, que impede a infiltração de microrganismos (Pawar *et al.*, 2014). Ademais, o pH alcalino pode promover a cicatrização apical e a mineralização dos tecidos. Em 2020, Barbosa e colaboradores avaliou através de um estudo *in vitro* o potencial antibacteriano dos cimentos Bio-C Sealer (Angelus), EndoFill (Dentsply), Sealer 26 (Dentsply), AH Plus (Dentsply), Sealapex (Sybron-Kerr, EUA) e EndoSequence BC Sealer (Brasseler) contra as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *S. mutans* pelo método de difusão em ágar. O Bio-C Sealer (Angelus) exibiu atividade antimicrobiana contra todas as bactérias, exceto *S. mutans* (Barbosa *et al.*, 2020).

Em 2019, os autores López-García *et al.* realizaram um estudo *in vitro* investigando a biomineralização dos cimentos Bio-C Sealer (Angelus), TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire) em comparação ao AH Plus (Dentsply), puderam observar formação de uma matriz mineralizada, revelando assim seu potencial osteogênico através de células-tronco do ligamento periodontal humano. Os cimentos endodônticos foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura. O Bio-C Sealer (Angelus) e o TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire) demonstraram melhor capacidade de mineralização do que o AH Plus (Dentsply) (López-García *et al.*, 2019).

Outro atributo desses cimentos é sua excelente radiopacidade, superior a 7 mm na escala de Alumínio, apresentando como radiopacificador, o óxido de zircônia que não causa manchamento. Além disso, esses cimentos não sofreram contração ao tomarem presa (Silva *et al.*, 2020). Zordan-Bronzel e colaboradores, em 2019, através

de um estudo *in vitro* avaliam a solubilidade, após 30 dias de imersão em água destilada e a variação volumétrica, por análise radiográfica em milímetros de alumínio. Os cimentos avaliados foram Bio-C Sealer (Angelus), TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire) e AH Plus (Dentsply). O Bio-C Sealer (Angelus) apresentou curto tempo de presa, capacidade de alcalinização, fluxo e radiopacidade adequados, além de baixa alteração volumétrica, sendo associado com melhor penetração nos túbulos dentinários (Zordan-Bronzela *et al.*, 2019).

Em 2024, outra análise *in vitro* avaliando a penetração nos túbulos dentinários em pré-molares inferiores, foi o estudo da Verma e colaboradores. Os elementos foram preparados usando ProTaper Gold (Dentsply, De Trey, Konstanz, Alemanha) e obturados com os cimentos Bio-C Sealer íon + (Angelus) ou AH Plus (Dentsply) e cone único. Os resultados do estudo concluíram que o cimento Bio-C Sealer íon + (Angelus) apresentou máxima penetração nos túbulos dentinários (Verma *et al.*, 2024).

Além desses cimentos possuírem adesão química a dentina, eles não agredem aos tecidos perirradiculares por serem biocompatíveis. Em 2020 Silva e colaboradores no estudo *in vivo* analisaram a quantidade de células inflamatórias presentes ao redor dos tubos de polietileno preenchidos com os cimentos Bio-C Sealer (Angelus), Sealer Plus BC (MK Life) e AH Plus (Dentsply), assim como a densidade da cápsula fibrosa formada ao redor do tubo. Após análise laboratorial, observou-se que a quantidade de células inflamatórias diminuiu progressivamente no período de 60 dias. A cápsula manifestou reação inflamatória moderada e observados fibroblastos, entremeados por fibras colágenas. Os autores relataram que o cimento Bio-C Sealer (Angelus) apresentou biocompatibilidade (Silva *et al.*, 2020).

Apesar dos cimentos Bio-C Sealer (Angelus) e Bio-C Sealer íon + (Angelus) apresentarem boa aceitação pelos tecidos perirradiculares por se apresentarem biocompatíveis, não significa que os materiais devam ser extruídos de forma intencional, pois não há evidências científica de que a extrusão promova melhor selamento apical (Aminoshariae & Kulild, 2020). O grande risco de inflamações crônicas na região periapical tem uma relação íntima com o material relacionado ao extravasamento e sua quantidade (Aminoshariae & Kulild, 2020).

Ademais, com base nos avanços da investigação científica e nas inovações tecnológicas em endodontia, o cimento Bio-C Sealer (Angelus) tem demonstrado

apoio ao sucesso do tratamento endodôntico, como uma proposta diferenciada e inovadora, apresentando a seguinte composição: Silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão. Já o cimento Bio-C Sealer íon + (Angelus) é composto por silicato de cálcio e magnésio, sulfeto de cálcio, sulfeto de potássio, óxido de zircônia, dióxido de silício e agente dispersante. Embora seja promissor devido à sua composição, ainda são necessários mais estudos para validar e confirmar plenamente suas propriedades e eficácia na prática clínica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as atividades antimicrobiana e imunomodulatória na presença dos cimentos Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon +, em comparação ao AH Plus.

3.2 Objetivo Específicos

- Avaliar a capacidade de inibição do crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis* na presença dos cimentos Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + e AH Plus;
- Avaliar a toxicidade dos cimentos Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + e AH Plus em culturas de células hPDLSC;
- Avaliar o potencial proliferativo e migratório das culturas células hPDLSC na presença dos cimentos Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + e AH Plus;
- Avaliar a expressão genética de mediadores inflamatórios (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*) e anti-inflamatórios (*IL-10*) nas células hPDLSC estimuladas com antígenos mortos pelo calor de *C. albicans* e *E. faecalis* na presença dos cimentos Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + e AH Plus.

4. MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

O presente estudo foi uma avaliação do potencial antimicrobiano, citotóxico, proliferativo, migratório e imunoinflamatório *in vitro*, dos cimentos Bio-C Sealer (Angelus), Bio-C Sealer íon + (Angelus), em comparação ao AH Plus (Dentsply), de acordo com a Figura 1. O objetivo final foi certificar o potencial dos cimentos biocerâmicos como produto inovador para terapia endodôntica, quando comparados às características do cimento considerado padrão ouro.

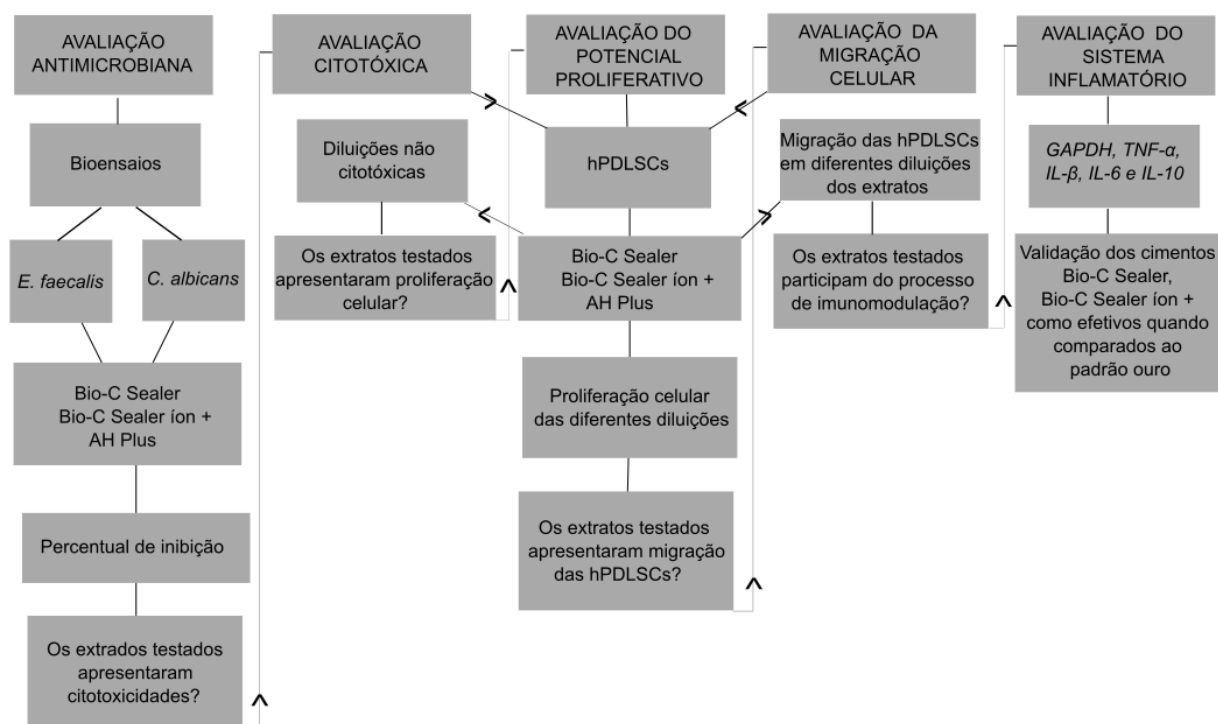


Figura 1 – Fluxograma representativo das fases da pesquisa.

4.2 Preparação dos Cimentos

Três diferentes cimentos endodônticos foram avaliados: AH Plus (Dentsply International Inc, York, PA, EUA), Bio-C Sealer (Angelus, Londrina, PR, Brasil) e Bio-

C Sealer íon + (Angelus). O AH Plus (Dentsply) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, enquanto o Bio-C Sealer (Angelus) e o Bio-C Sealer íon + (Angelus) estavam prontos para uso. Os cimentos (40 mg) foram preparados em placas de cultura de 24 poços e incubados por 48 h a 37 °C. Após a presa, 2,5 mL de meio de cultura foram adicionados para preparar o extrato. Os meios utilizados foram meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Cultilab, Campinas, SP, Brasil), meio infusão de cérebro e coração (BHI) (Sigma Chemicals Co., St Louis, EUA) e meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com MOPS (0,165 mol.L⁻¹) dependendo do experimento a ser realizado, incubados a 37 °C por 24 h, de acordo com a International Organization for Standardization (ISO) 10993-5. Após 24 h, os extratos foram coletados e filtrados com filtros estéril de 0,22 µm. Em seguida, foram realizadas diluições (1:2 e 1:4) (Tomas *et al.*, 2018). Os extratos de cada cimento foram analisados por ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).

4.2.1 Efeito dos cimentos AH Plus, Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + na atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e *C. albicans*

A atividade antimicrobiana foi baseada no protocolo de ensaio de inibição de crescimento por microdiluição em caldo, de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute, com adaptações (Wiegand *et al.*, 2008). Inicialmente, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para *C. albicans* (ATCC 10231) e *E. faecalis* (ATCC 29212). Os bioensaios de *E. faecalis* foram testados em meio BHI (Sigma) na concentração de 5x10⁵ UFC.mL⁻¹, em fase logarítmica. As placas foram incubadas por 18 h, a 37 °C, em temperatura média. O ensaio inibitório para *C. albicans* foi realizado em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com MOPS (0,165 mol.L⁻¹), utilizando uma concentração inicial de 2,5x10³ UFC.mL⁻¹ por poço na fase logarítmica. As placas foram incubadas por 48 h a 30 °C, em temperatura média. Os ensaios antibacterianos e antifúngicos foram determinados pela prevenção total ou percentual do crescimento. Nos casos de inibição de 100%, a capacidade bactericida e fungicida também foram avaliadas. Adicionalmente, foi realizada uma verificação do pH.

4.2.2. **Cultura primária de hPDLSC**

Inicialmente, terceiros molares doados após extração foram utilizados neste estudo após aprovação pelo comitê de ética (CAAE: 62741822.2.0000.0029 – anexo 1). Após a extração dos dentes, eles foram armazenados em 10 mL de DMEM (Gibco) com 200 µL de anfotericina B (Sigma) e 10 µL de gentamicina (Sigma) (Huang *et al.*, 2006). As células do ligamento periodontal (hPDLSC) foram obtidas por raspagem da raiz do dente extraído. Em seguida, o ligamento periodontal foi transferido para uma placa de 6 poços e cultivado em meio DMEM (Gibco), suplementado com 50 U.mL⁻¹ de penicilina (Gibco), 50 µg.mL⁻¹ de estreptomicina (Gibco) e 20% de soro bovino fetal (FBS) (Cultilab). A cultura foi incubada em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ (Pedrosa *et al.*, 2022). Após a confluência, a monocamada celular foi recuperada com 300 µL de solução de tripsina 0,5% (p/v) (Sigma, St. Louis, EUA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM (Sigma), por 2 min, a 37 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm, por 5 min e fornecidas a pequenos frascos de cultura contendo DMEM (Gibco), suplementado com 2 nM de glutamina (Gibco, Califórnia, EUA), 50 U.mL⁻¹ de penicilina (Gibco), 50 µg.mL⁻¹ de estreptomicina (Gibco) e 10% de SFB (Cultilab) (Al-Habib *et al.*, 2019).

4.2.3. **Efeito do Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + e AH Plus na viabilidade de hPDLSC**

A toxicidade dos cimentos foi avaliada na cultura de hPDLSC. Inicialmente, hPDLSC (1x10⁴ células.mL⁻¹) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h em uma incubadora de CO₂ a 37 °C. Após esse período, 200 µL de sobrenadante celular foram trocados por extratos dos cimentos, e as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) foi realizado e as placas foram lidas a 570 nm (Loosdrecht *et al.*, 1991).

4.2.4. Efeito do AH Plus, Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + na migração e proliferação de hPDLSC

A avaliação da migração celular foi realizada usando o método *scratch* (He *et al.*, 2022). Neste ensaio, células ($2,5 \times 10^5$ células por poço) foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (Prolab) em meio DMEM (Gibco), suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Gibco) e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco) e 10% de SFB (Cultilab), mantidas até que uma monocamada confluyente fosse formada. Em seguida, uma ferida artificial foi reproduzida nas superfícies dos poços com uma ponta de micropipeta de plástico de $1000 \mu\text{L}$. As células restantes foram lavadas e novo meio DMEM (Gibco), suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Gibco) e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco) foi adicionado junto com extratos cimentos (1:1, 1:2 e 1:4). As culturas foram incubadas e monitoradas por até 48 h. Fotografias com auxílio de microscopia foram tiradas em 0, 24 e 48 h. As imagens foram processadas e as células localizadas na região da ferida foram contadas com o auxílio do software Image J (NIH, Bethesda, MD).

O potencial proliferativo de hPDLSC foi realizado usando a técnica de exclusão de *Trypan Blue* (Tomás *et al.*, 2020). hPDLSC (1×10^4 células) foram incubadas com extratos de AH Plus (Dentsply), Bio-C Sealer (Angelus) e Bio-C Sealer íon + (Angelus) (1:1, 1:2 e 1:4) por 24 e 48 h. Posteriormente, as células foram ressuspensas e uma solução de corante Trypan Blue a 0,4% (Sigma) foi adicionada por 1 minuto. O número de células foi imediatamente contado e comparado com o número inicial de células.

4.2.5. Efeito de AH Plus, Bio-C Sealer e Bio-C Sealer íon + na expressão do gene da citocina

A expressão de *TNF- α* , *IL- β* , *IL-6* e *IL-10* por hPDLSC incubados com extratos dos cimentos foi avaliada pelo método de PCR em tempo real. Para realizar diferentes condições de cultura *in vitro*, estímulos adicionais foram representados por LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*, Sigma) e IFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Interferon-gama, Sigma) e a união de ambos por 24 h. Todos os cimentos foram avaliados em todas essas condições. Após a cultura celular, o RNA foi removido pelo método TRizol™ (ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA) (Xu *et al.*, 2021). Em

seguida, a quantificação do RNA foi determinada pelo Qubit® (Bustin *et al.*, 2009). A análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real com o sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher) para verificar a expressão de genes indicativos de processos inflamatórios e anti-inflamatórios. Para essa análise, foi avaliada a expressão dos genes *TNF- α* , *IL- β* , *IL-6* e *IL-10*. O gene constitutivo utilizado foi o *GAPDH*. A ocorrência de quantificação foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação teve um volume final de 10 μ L, composto por: 5 μ L de SYBR Green; 0,5 μ L de primers, sendo 0,25 μ L de primer para cada gene (Tabela 1); e 2,5 μ L de Nuclease-free Water (ThermoFisher Scientific - SYBR™ Green PCR Master Mix KIT). Os níveis de expressão relativa no grupo experimental foram calculados por $\Delta(\Delta CT)(\Delta CT_{Control} - \Delta CT_{Experiment})$ (Bustin *et al.*, 2009).

GENE	PRIMER SEQUENCE (5'-3')
<i>TNF-α</i>	<i>Direto</i> CACAGTGAAGTGCTGGCAAC <i>Reverso</i> GATCAAAGCTGTAGGCCCA
<i>IL-1β</i>	<i>Direto</i> GCACTACAGGCTCCGAGATGAA <i>Reverso</i> GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT
<i>IL-6</i>	<i>Direto</i> CCCACCAGGAACGAAAGTCA <i>Reverso</i> GGCAACTGGCTGGAAGTCTCT
<i>IL-10</i>	<i>Direto</i> TAAGGGTACTTGGGTTGCCA <i>Reverso</i> TCTGGGCCATGGTTCTCTG
<i>GAPDH</i>	<i>Direto</i> AGTGGCAAAGTGGAGATT <i>Reverso</i> GTGGAGTCATACTGGAACA

Tabela 1: Sequência de primers para cada gene usado no ensaio de PCR.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em três réplicas técnicas e repetidos em três momentos independentes. De acordo com a análise estatística, a distribuição normal foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram descritos como média e desvio padrão (DP). A análise estatística dos dados foi realizada usando análise unidirecional e análise bidirecional, quando necessário, variância e pós-teste de comparação múltipla de Tukey também foram usados, com significância de $p < 0,05$.

6. CAPÍTULO 1: Manuscrito

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

BIOCERAMIC FILLING CEMENTS AND PERIODONTAL LIGAMENT CELLS: ANTIMICROBIAL EFFECTS, TOXICITY, MIGRATION AND IMMUNE RESPONSE

Abstract

Bioceramic filling cements help in the burial of microorganisms by sealing the dentinal tubules and isolating the communication between the root canal and the periradicular space. However, Bio-C Sealer íon +, an innovative bioceramic material, there is little information about its biological effects and its performance over time, especially in relation to the interaction with periodontal tissues. Furthermore, these materials demonstrate bioactivity in periradicular tissues. Thus, this study evaluated the antimicrobial, cytotoxic, proliferative, migratory and immunomodulatory potential of extracts from bioceramic cements Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + and resin cement AH Plus, in primary culture of human periodontal ligament cells (hPDLSC) and in microorganisms. Initially, the antimicrobial activity of the sealer extracts was verified by evaluating the minimum inhibitory concentration for the growth of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Subsequently, the toxicity of sealer extracts was verified in culture of hPDLSC by MTT assay. Next, the proliferative and migratory effects of these sealers were evaluated by the scratch assay in hPDLSC cultures. Finally, the effect of the sealers on gene expression by PCR was evaluated, as were the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (*TNF- α*), interleukin (*IL*)-1 β and *IL*-6, and the regulatory cytokine *IL*-10, in different experimental situations. Statistical differences were checked using unidirectional and bidirectional anova and *Tukey post-tests*. The results demonstrated that AH Plus and Bio-C sealer íon + inhibited 100% of the growth of *E. faecalis* in the presence of extracts (1:1, 1:2 and 1:4). However, only the 1:1 extracts of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + inhibited 100% of the growth of *C. albicans*. The toxicity of the cements was

demonstrated in a dose-dependent manner in hPDLSC cultures, so that the lowest viability percentages were observed in the presence of undiluted extracts of AH Plus (55%), Bio-C Sealer (69%) and Bio-C Sealer íon + (72%) ($p < 0,0001$). In the scratch assay, it was observed that the extract of the Bio-C Sealer íon + cement (1:4) ($p < 0,0001$) allowed the highest rate of cell migration and proliferation after 48h, compared to the data of the AH Plus and Bio-C Sealer. Finally, we demonstrated that AH Plus increased gene expression of the cytokines *TNF- α* , *IL-6* and *IL-10* in all conditions tested. An increase in *IL-1 β* expression was also shown in comparison to the Bio-C sealant, *in vitro*. Therefore, it is concluded that, compared to the other cements tested, the Bio-C Sealer íon + proposed greater recommendations, supervision and cell migration, in addition to presenting an effective antimicrobial action, without inducing the expression of pro-inflammatory cytokines.

KEYWORDS: antimicrobials, bioceramics, biocompatibility, toxicity, bioactivity.

INTRODUCTION

Endodontic treatment aims to reduce the microbial load and virulence in the root canals to allow the patient's immune system to develop repair mechanisms (Neelakantan 2019). Although physical-mechanical preparation and intracanal medications significantly reduce microorganisms, it is almost impossible to completely eliminate them (Kapralos *et al.*, 2018). The main factors associated with the failure of endodontic treatment include inadequate chemical-mechanical preparation and unsatisfactory root canal filling (Tabassumkhan, 2016). In addition, inadequate apical-coronal sealing allows the entry of tissue fluids, providing nutrients for the remaining microorganisms that can cause periradicular lesions (Zoletti *et al.*, 2006). Microorganisms such as *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* are often associated with endodontic therapy failure, as they can invade deeply into the dentinal tubules and survive endodontic procedures (De Almeida *et al.*, 2016; Mergoni *et al.*, 2018).

Therefore, root canal sealers should have properties that contribute to a favorable prognosis (Tabassum and Khan, 2016). An ideal root canal sealer should

offer good sealing, adhesion to the canal walls, radiopacity, biocompatibility, and infection control (Viapiana *et al.*, 2016). Nowadays, epoxy resin-based sealers, such as AH Plus, stand out for their sealing properties, biocompatibility, and antimicrobial activity (Gong *et al.* 2014). AH Plus is one of the most widely used and trusted endodontic sealers (Resende *et al.*, 2009) and is currently considered the gold standard (Assmann *et al.*, 2012). However, the lack of chemical adhesion between tooth structure and root obturation is a constant challenge, leading to the search for new biomaterials, such as bioceramic sealers, which offer better dentin adhesion and other improved properties (Al-Haddad *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2024).

Bioceramic materials represent a significant advance in endodontics due to their biocompatibility properties and ability to induce tissue regeneration (Camilleri *et al.*, 2022). These sealers, also called hydraulic sealers, react with root canals' humidity to form hydroxyapatite, leading to osteoconductive and antibacterial effects (Camilleri *et al.*, 2022). Therefore, many bioceramic endodontic sealers are being launched on the market.

Bio-C Sealer is one of these sealers, and it is effective in the formation of hydrated calcium silicate and the release of calcium ions, stimulating the formation of mineralized tissue, a process called bioactivity that promotes rapid tissue regeneration (Tolosa-Monfà *et al.*, 2023). Furthermore, it has antibacterial and bacteriostatic action due to its high alkalinity and sealing capacity, which prevent microorganism infiltration (Silva *et al.*, 2016). Its new version, Bio-C Sealer ion +, promises greater release of calcium, magnesium, and silane ions, improving their properties (Sanz *et al.*, 2020). Although bioceramic sealers have demonstrated good strength and sealing in short- and medium-term studies, there is a need for more research into their long-term performance. Therefore, this study aims to evaluate the potential effects of Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion + extracts on antimicrobial activity and primary culture of human periodontal ligament cells (hPDLSC), compared to AH Plus. These results may clarify the properties of these recent root canal sealers.

MATERIALS AND METHODS

Sealer Preparation

Three different endodontic sealers were evaluated: AH Plus (Dentsply International Inc, York, PA, USA), Bio-C Sealer (Angelus, Londrina, PR, Brazil), and Bio-C Sealer íon + (Angelus). AH Plus was prepared according to the manufacturer's instructions, while Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + were ready for use. Sealers (40 mg) were prepared in 24-well culture plates and incubated for 48 h at 37 °C. After setting, 2.5 mL of culture medium were added to prepare the extract. The media used were Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS - Cultilab, Campinas, SP, Brazil), brain heart infusion (BHI) medium (Sigma Chemicals Co., St Louis, USA), and RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with MOPS (0.165 mol.L⁻¹) depending on the experiment to be performed, incubated at 37 °C for 24 h, according to the International Organization for Standardization (ISO) 10993-5. After 24 h, the extracts were collected and filtered with 0.22 µm sterile filters. Then, dilutions (1:2 and 1:4) were performed (TOMAS *et al.*, 2018). Extracts from each sealer were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) (Supplementary Figure 1).

Effect of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + sealers on antimicrobial activity against *E. faecalis* and *C. albicans*

The antimicrobial activity was based on the broth microdilution growth inhibition assay protocol, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute, with adaptations (Wiegand *et al.*, 2008). Initially, the minimum inhibitory concentrations (MIC) for *C. albicans* (ATCC 10231) and *E. faecalis* (ATCC 29212) were determined. *E. faecalis* bioassays were tested in BHI medium (Sigma) at a concentration of 5x10⁵ CFU.mL⁻¹, in logarithmic phase. Plates were incubated for 18 h, at 37 °C, at medium temperature. The inhibitory assay for *C. albicans* was performed in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with MOPS (0.165 mol.L⁻¹), using an initial concentration of 2.5x10³ CFU.mL⁻¹ per well in the logarithmic phase. Plates were incubated for 48 h at 30 °C, at medium temperature. The antibacterial and antifungal assays were

determined by total or percentage prevention of growth. In cases of 100% inhibition, the bactericidal and fungicidal capacity were also evaluated. Additionally, a pH check was performed.

Primary culture of periodontal ligament cells

Initially, third molars donated after extraction were used in this study after approval by the ethics committee (CAAE: 62741822.2.0000.0029). After teeth had been extracted, they were stored in 10 mL of DMEM (Gibco) with 200 μL of amphotericin B (Sigma) and 10 μL of gentamicin (Sigma) (Huang *et al.*, 2006). HPDLSC were obtained by root scraping of the extracted tooth. Then, periodontal ligament was transferred to a 6-well plate and cultured in DMEM medium (Gibco), supplemented with 50 U.mL^{-1} of penicillin (Gibco), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of streptomycin (Gibco), and 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Cultilab). The culture was incubated in a humidified atmosphere with 5% CO_2 (Pedrosa *et al.*, 2022). After confluence, the cell monolayer was recovered with 300 μL of 0.5% (w/v) trypsin solution (Sigma, St. Louis, USA) and 10 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) (Sigma), for 2 min, at 37 $^\circ\text{C}$. Then, cells were centrifuged at 1,500 rpm, for 5 min and provided to small culture flasks containing DMEM (Gibco), supplemented with 2 nM glutamine (Gibco, California, USA), 50 U.mL^{-1} penicillin (Gibco), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin (Gibco) and 10% FBS (Cultilab) (AL-HABIB *et al.*, 2019).

Effect of Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + and AH Plus on hPDLSC viability

Sealers toxicity was evaluated in hPDLSC culture. Initially, hPDLSC (1×10^4 cells. mL^{-1}) were cultured in 96-well plates for 24 h in a CO_2 incubator at 37 $^\circ\text{C}$. After this period, 200 μL of cell supernatant was exchanged for sealer extracts, and plates were again incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After the incubation period, the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was performed and plates were read at 570 nm (Loosdrecht *et al.*, 1991).

Effect of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + on the migration and proliferation of hPDLSC

Cell migration assessment was performed using the scratch method (He *et al.*, 2022). In this assay, cells (2.5×10^5 cells per well) were seeded in 6-well culture plates (Prolab) in DMEM medium (Gibco), supplemented with $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ penicillin (Gibco) and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin (Gibco) and 10% FBS (Cultilab), maintained until a confluent monolayer was formed. Then, an artificial wound was reproduced on well surfaces with a $1000 \mu\text{L}$ plastic micropipette tip. Remaining cells were washed and new DMEM medium (Gibco), supplemented with $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ penicillin (Gibco) and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin (Gibco) was added together with sealer extracts (1:1, 1:2 and 1:4). Cultures were incubated and monitored for up to 48 h. Photographs with the aid of microscopy were taken at 0, 24 and 48 h. Images were processed, and cells located in the wound region were counted with the aid of Image J software (NIH, Bethesda, MD).

The proliferative potential of hPDLSC was performed using the Trypan Blue exclusion technique (Cheng *et al.*, 2017). HPDLSC (1×10^4 cells) were incubated with extracts of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion + (1:1, 1:2 and 1:4) for 24 and 48 h. Subsequently, cells were resuspended, and a 0.4% Trypan Blue dye solution (Sigma) was added for 1 minute. Cell numbers were immediately counted and compared with the initial cell number.

Effect of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion + on cytokine gene expression

Expression of *TNF- α* , *IL- β* , *IL-6* and *IL-10* by hPDLSC incubated with sealer extracts was evaluated by real-time PCR method. To perform different *in vitro* culture conditions, additional stimuli were represented by LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (*Escherichia coli* lipopolysaccharides, Sigma) and LPS+IFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Interferon-gamma, Sigma) and the union of both for 24 h. All sealers were evaluated in all these conditions. After cell culture, RNA was removed by the TRIzol™ method (ThermoFisher Scientific, California, USA) (Xu *et al.*, 2021). Then, RNA quantification was determined by Qubit® (Bustin *et al.*, 2009). Gene expression analysis was performed by real-time PCR with StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher) in order to verify the expression of genes indicative of inflammatory and anti-inflammatory processes. For this analysis, the expression of *TNF- α* , *IL- β* , *IL-6* and *IL-10* genes was evaluated.

GAPDH was used as the constitutive gene. The quantification occurrence was prepared according to the manufacturer's recommendations. Each reaction had a final volume of 10 μ L, consisting of: 5 μ L of SYBR Green; 0.5 μ L of primers, with 0.25 μ L of primer for each gene (Table 1); and 2.5 μ L of Nuclease-free Water (ThermoFisher Scientific - SYBR™ Green PCR Master Mix KIT). The relative expression levels in the experimental group were calculated by $\Delta(\Delta CT)(\Delta CT_{Control} - \Delta CT_{Experiment})$ (Bustin *et al.*, 2009).

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

Table 1: Sequence of primers for each gene used in the PCR assay.

Statistical analyses

All experiments were carried out in three technical replicates and repeated at three independent moments. According to statistical analysis, normal distribution was verified by Shapiro–Wilk test. Data were described as mean and standard deviation (SD). Statistical analysis of the data was performed by using one-way analysis and two-way anova analysis; when necessary, variance and Tukey's multiple-comparison post-test were also used, with significance of $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of Bio-C Sealer, Bio-C Sealer íon + and AH Plus on *E. faecalis* and *C. albicans* antimicrobial activity

AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + were analyzed for their bacterial growth inhibition against *E. faecalis* and *C. albicans*. Note that AH Plus and Bio-C

Sealer ion + were demonstrated to inhibit 100% of *E. faecalis* growth in the presence of sealer extracts (1:1, 1:2 and 1:4). Bio-C Sealer was demonstrated to inhibit 100% of bacteria inhibition only in the presence of undiluted-sealer extracts. However, diluted sealer extracts 1:2 and 1:4 inhibited 98% and 85% of bacterial growth, respectively (Table 1). Bactericidal effects were also detected in the presence of AH Plus (1:1), Bio-C Sealer (1:1) and Bio-C Sealer ion + (1:1, 1:2 and 1:4).

Regarding fungal growth inhibition against *C. albicans* (ATCC 10231), note that undiluted extracts of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion + inhibited 100% of fungal growth. However, 1:2 and 1:4 sealer extracts demonstrated different percentages of fungal growth, as shown in Table 1. Nonfungicidal activity was detected. Additionally, a pH check was performed which ranged from 7.1 to 8.1.

SEALERS	pH	MIC <i>E. faecalis</i>	MBC <i>E. faecalis</i>	MIC <i>C. albicans</i>	MFC <i>C. albicans</i>
AH Plus (1:1)	7.1	D	D	D	ND
AH Plus (1:2)	8.0	D	ND	ND (82%)	ND
AH Plus (1:4)	7.4	D	ND	ND (73%)	ND
Bio-C Sealer (1:1)	8.1	D	D	D	ND
Bio-C Sealer (1:2)	8.0	ND (98%)	ND	ND (96%)	ND
Bio-C Sealer (1:4)	7.7	ND (85%)	ND	ND (0%)	ND
Bio-C Sealer ion + (1:1)	7.8	D	D	D	ND
Bio-C Sealer ion + (1:2)	8.1	D	D	ND (98%)	ND
Bio-C Sealer ion + (1:4)	7.8	D	D	ND (91%)	ND

Table 2. Growth inhibition of *E. faecalis* e *C. albicans* in the presence of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion +. Positive control was represented by Ampicillin 20 µg.mL⁻¹ and Amphotericin B 10 µg.mL⁻¹. pH of each sealer extract was demonstrated. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) are represented by Detected (D) and Not Detected ND. Non-detected MIC was followed by percentage of microorganism inhibition between parentheses.

Effect of Bio-C Sealer, Bio-C Sealer ion + and AH Plus on hPDLSC viability

AH Plus extracts decreased cell viability in a dose-dependent way, leading to 55.46% cell viability in contact with the 1:1 extract ($p=0.002$); 67.93%, in contact with 1:2 extract ($p=0.0001$); and 80.65%, in contact with 1:4 ($p>0.05$) extract, compared to control group (Figure 1A). Regarding Bio-C Sealer, a similar dose-dependent relationship was observed: 69.66% cell viability in contact with 1:1 extract ($p<0.0001$); 85.28%, in contact with 1:2 extract ($p<0.05$); and 93.84% in contact with 1:4 extract ($p>0.05$), compared to control group (Figure 1B). In addition, Bio-C Sealer ion + extracts demonstrated the smallest cellular difference compared to the control group, leading to a 28.4% decrease in cell viability in the presence of 1:1 extract ($p<0.0001$),

a decrease of 10.66% in the presence of 1:2 ($p>0.05$) extract and 5.05% in the presence of 1:4 ($p>0.05$) extract, compared to control (Figure 1C). At different concentrations of the extracts, greater toxicity was observed in non-diluted extracts (Figure 1).

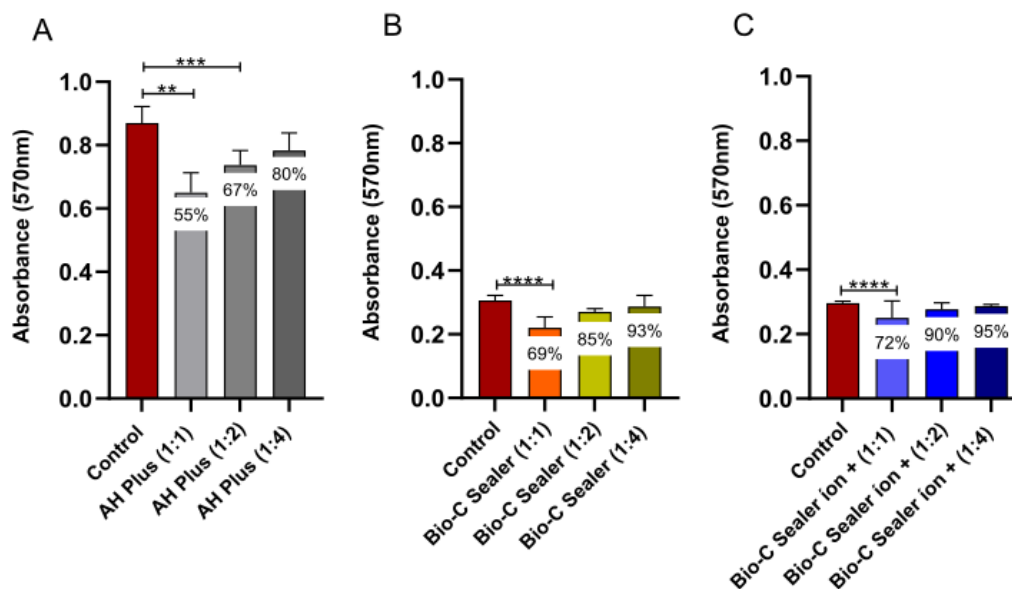


Figure 1. hPDLSC viability by MTT assay. hPDLSC viability after 24 h of incubation with AH Plus (A), Bio-C Sealer (B) and Bio-C Sealer ion + (C) extracts (1:1, 1:2 and 1:4). Graphs represent the mean and standard deviation of the absorbance and percentage of cell viability of three biological replicates performed in technical triplicates. ** $p=0.002$; *** $p=0.0001$ and **** $p<0.0001$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test.

Effect of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion + on the migration and proliferation of hPDLSC

Apical tissue repair is directly related to hPDLSC proliferation and migration. Undiluted extracts of Bio-C Sealer ion + up-regulated the number of migrated cells compared to undiluted extracts of Bio-C Sealer, AH plus, and control ($p<0.05$, $p=0.002$ and $p=0.002$, respectively – Figure 2A), after 24 and ($p<0.05$, $p=0.002$ and $p<0.05$ – Figure 2A) 48 h. In addition, both bioceramic sealers up-regulated cellular migration in comparison to AH Plus ($p>0.05$ and $p=0.002$, respectively). However, despite the high viability of hPDLSC in the presence of Bio-C Sealer ion +, the wound closure was not accompanied by cell proliferation (Figure 2B). This analysis was followed by evaluating the effect of different dilutions of each tested sealer on hPDLSC migration. A dose-dependent relationship was observed in the migration of hPDLSC after 24 and 48 h, where the lower the sealer dilution, the greater the number of migrated cells ($p=0.002$ – Supplementary figure 2; $p<0.05$ and $p=0.002$ – Supplementary figure 3; $p<0.05$ and $p=0.002$ – Supplementary figure 4). Regarding the proliferation of hPDLSC in different

sealer dilutions, after 48 h, although a slight proliferation was observed in the presence of all sealers with greater dilution, it was only in the presence of Bio-C Sealer ion + (1:4) that this difference was statistical ($p < 0.0001$ – Supplementary Figure 4).

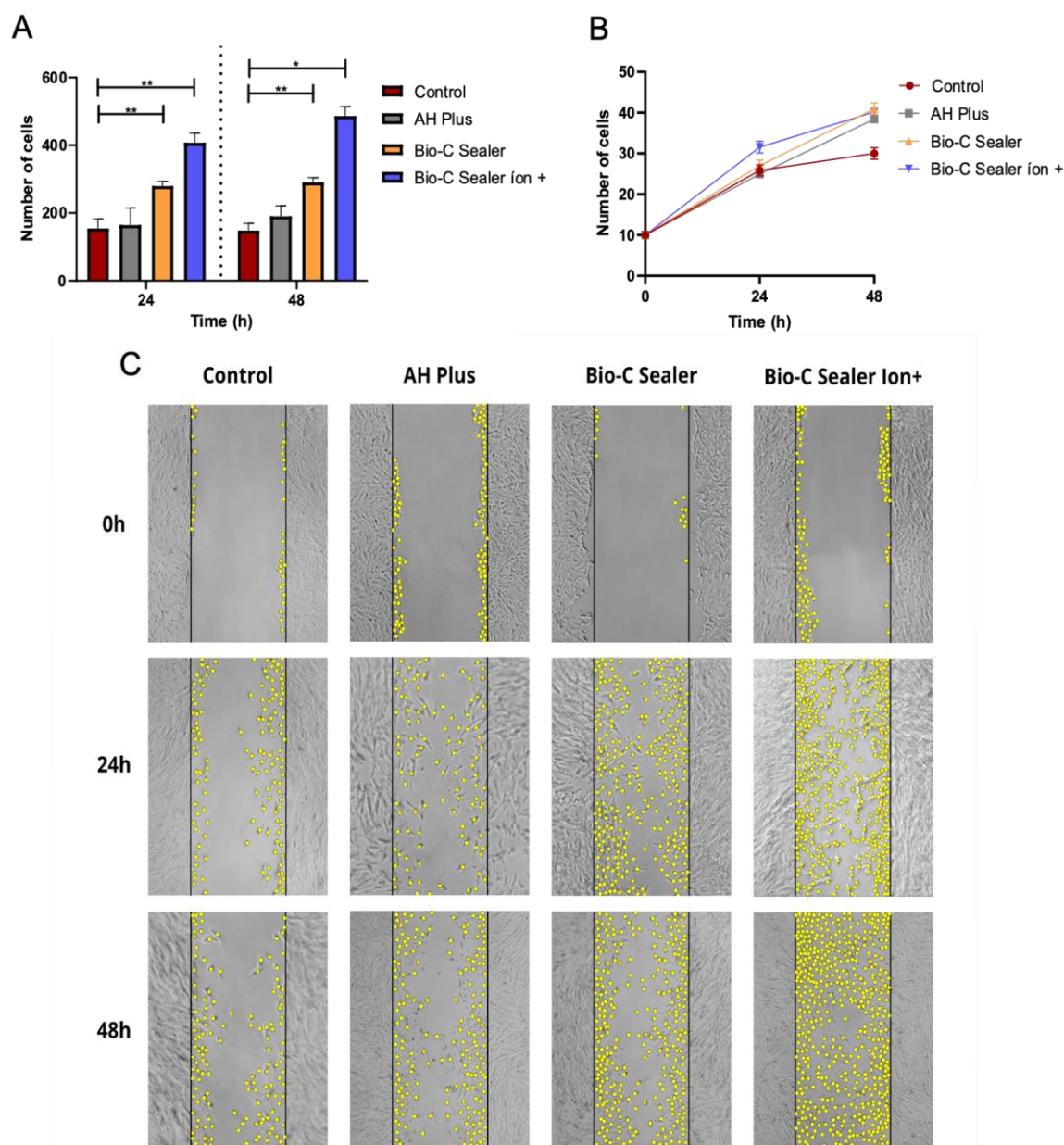


Figure 2. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion + extracts (1:1), after 24 h and 48 h. (A) Percentage of cells migrated to the wound in 24 h and 48 h. * $p < 0.05$ and ** $p = 0.002$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion + extract (1:1). (C) Representative image of the cell migration test, using the scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.

Effect of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + on cytokine gene expression by hPDLSC

TNF- α , *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-10* gene expression by hPDLSC after exposure to tested sealers in different *in vitro* conditions (basal, plus LPS, and plus LPS and IFN- γ) were evaluated (Figure 3). AH Plus was able to up-regulate *TNF- α* (Figure 3A, $p=0.0001$; B, $p=0.0001$; and C, $p=0.0001$), *IL-6* (Figure 3G, $p<0.0001$; H, $p<0.0001$; and I, $p<0.0001$) and *IL-10* (Figure 3J, $p=0.0001$; K, $p=0.002$; and L, $p>0.05$) gene expression in all *in vitro* tested conditions. In contrast, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + did not affect *TNF- α* (Figure 3A, B and C), *IL-6* (Figure 3G, H and I) and *IL-10* (Figure J, K and L) gene expression in all conditions. AH plus also up-regulated the *IL-1 β* gene expression in comparison to Bio-C Sealer in LPS and IFN- γ stimulated condition (Figure 3F, $p<0.05$). These results demonstrate the potential of AH plus to activate cytokine production, while bioceramic sealers maintained basal levels of cytokines, under different experimental conditions.

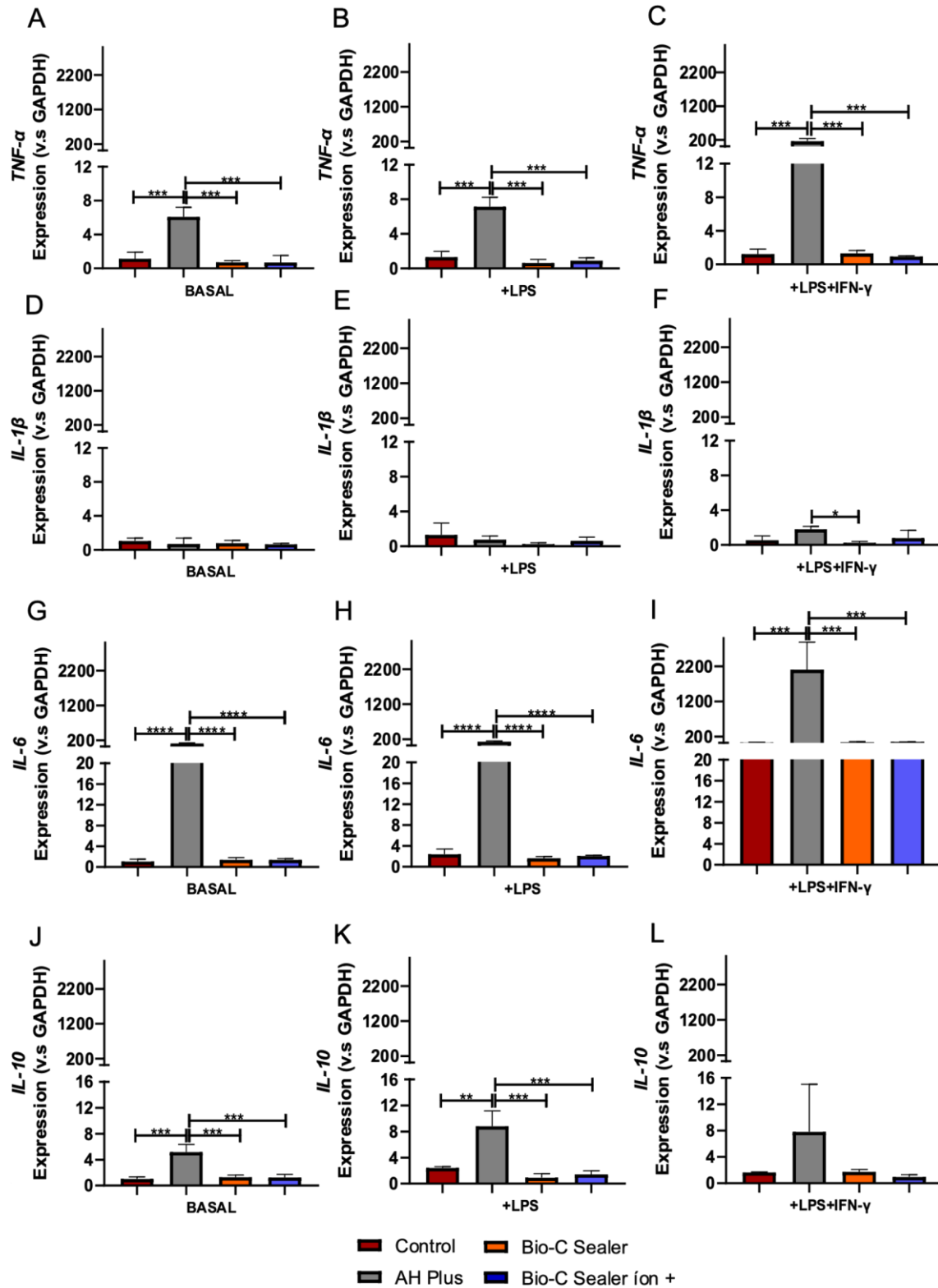


Figure 3. *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* and *IL-10* genes expression. By hPDLSC. Cells when exposed to AH Plus (1:1), Bio-C Sealer (1:1) and Bio-C Sealer ion+ (1:1) in different conditions: basal (A, D, G and J), stimulated with LPS (B, E, H and K) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and LPS plus FN- γ (C, F, I and L) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), after 24 h of incubation. Graphs represent mean and standard deviation of three biological replicates in technical triplicate. For analysis of *TNF-α* and *IL-1β* expression, the CT of samples that did not show amplification was set at 40. * $p < 0.05$, ** $p = 0.002$, *** $p = 0.0001$ and **** $p < 0.0001$ represent statistical difference verified by two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

DISCUSSION

Endodontic treatment failure is generally related to bacterial persistence and may involve poor chemical-mechanical preparation and improper filling of root canals (Tabassum and Khan, 2016). Inadequate coronal sealing followed by inadequate root canal filling allows tissue fluids to enter root canals, providing nutrients for the remaining microorganisms, leading to the development of periradicular lesions (Ricucci and Siqueira 2010). In this context, bioceramic sealers have been bringing technological advances, presenting better antibacterial properties and radiopacity (Zhang *et al.*, 2021). In addition, it is also important that root sealer should be biocompatible, since it can interact with periodontal tissues especially in situations of extravasation in the periradicular region (Sanz *et al.*, 2020; Parirokh and Torabinejad 2010). Thus, this study evaluated the antimicrobial effect and role of Bio-C Sealer (Angelus), Bio-C Sealer íon + (Angelus) and AH Plus (Dentsply) in the response of periodontal ligament cells.

Initially, it is known that the control of microorganisms can be decisive in the success of endodontic therapy. Therefore, it is desirable that endodontic sealer should present some antimicrobial effect (Siqueira and Rôças 2008). First, AH plus, Bio-C sealer and Bio-C sealer íon + were demonstrated to inhibit *E. faecalis* growth, even in the presence of diluted extracts of these sealers. The exceptions were diluted extracts of Bio-C sealer (1:2 and 1:4), which partially inhibited *E. faecalis* growth. Antibacterial effect was also observed in the presence of undiluted sealers, and Bio-C sealer íon + stood out, as it presents bactericidal action even in the presence of diluted extracts. Similarly, Viana (2021) reported antimicrobial activity against *E. faecalis* in the presence of AH Plus and Bio-C Sealer through the crystal violet assay. However, there are no previous studies on the antimicrobial activity of Bio-C Sealer íon + against *E. faecalis*. Subsequently, the antifungal effect of these sealers was evaluated. Undiluted extracts of AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer íon + were able to inhibit *C. albicans* growth, but without fungicidal effect. Previously, Hage (2023) reported inhibitory activity against *C. albicans* of AH Plus and Bio-C Sealer extracts. However, again, there are no antimicrobial studies reporting antifungal effect by Bio-C Sealer ion +.

In the next step, the toxicity of root sealer on periodontal ligament cells was evaluated. In many situations, periapical leakage after root canal filling is reported. During extravasation, this sealer comes into contact with hPDLSC, which can lead to difficulties in reestablishing these cells. In this study, a small decrease in the viability of hPDLSC was observed in the presence of undiluted sealer extracts, but with a minimum viability above 55%. The toxicity of all sealers was dose-dependent, and AH plus presented the greatest toxicity. According to Tolosa (2023), Bio-C Sealer presented moderate cytotoxicity while AH Plus presented severe cytotoxicity to fibroblast cell culture. In another study, Sanz (2020) observed greater viability of hPDLSC in contact with extracts (undiluted, proportions 1:2 and 1:4) of Bio-C Sealer ion + when compared to AH Plus. The absence of toxicity of bioceramic sealers, Bio-C Sealer (Angelus), Endosequence BC Sealer (BC), Sealer Plus BC (MK life) and MTA (Angelus) has also been observed in macrophages culture, demonstrating 90% of viable cells (Tavares *et al.*, 2024).

Since the results showed low toxicity of bioceramic sealers and moderate toxicity of AH plus, the effects of these on healing processes were evaluated, analyzing the proliferation and migration of hPDLSC. Cell migration occurs naturally in several biological processes, such as wound healing and during inflammatory conditions (Cheng 2015). Undiluted extracts of Bio-C Sealer ion + up-regulated the number of migrated cells, followed by undiluted extracts of Bio-C Sealer and AH Plus in relation to control group, after 24 and 48h. According to this, López (2019) demonstrated that Bio-C Sealer increased hPDLSC migration in relation to AH Plus. However, there are still no migration studies comparing Bio-C Sealer ion +. Our results also demonstrated that cell migration was not accompanied by hPDLSC proliferation. And on this topic, there are still no proliferation studies regarding Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion +.

During the repair process, immune reactions play an important role, which is often directed by cytokines produced. Therefore, the expression of cytokine genes was assessed in hPDLSC under different culture conditions: basal conditions, LPS-stimulated culture and LPS and IFN- γ -stimulated culture. The idea was to mimic periapical conditions involved in situations related to pulp necrosis and periradicular lesions. LPS is an abundant molecule in the outer membrane of gram-negative bacteria and plays a significant role in the inflammatory process by promoting several biological responses (Maldonado *et al.*, 2016). IFN- γ is a cytokine that activates intra

and intercellular networks to regulate innate and acquired immunity, in addition to increasing several pro-inflammatory parameters (Pucinelli *et al.*, 2022). Both stimuli were classic and previously described in several other studies (Liao *et al.*, 2019; Dhar *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2021).

In all tested conditions, AH-plus increased the expression of cytokines *TNF- α* , *IL-6*, and *IL-10*, while also increasing the expression of *IL-1 β* , in relation to the Bio-C sealer. In addition, bioceramic sealers maintained the expression of these cytokines at basal levels, in all conditions. Cytokine *TNF- α* is considered a marker of early inflammation (Song *et al.*, 2017). The presence of *TNF* will promote the recruitment of leukocytes, inducing vasodilation and stimulating the production of pro-inflammatory cytokines, such as *IL-6* (Hall *et al.*, 2016). In addition, cytokine *IL-6* is a cytokine related to both anti-inflammatory and pro-inflammatory actions. Studies also show *IL-6* as a protagonist during chronic inflammatory activity, in which it acts as a mediator between the acute and chronic phases (Buckley *et al.*, 2001). In addition, it is considered one of the main mediators of the host's response after aggression (Rodrigues *et al.*, 2021). On the other hand, cytokine *IL-10* presents an immunomodulatory role. It is a classic anti-inflammatory cytokine and is related to the regulation of tissue integrity and homeostasis, restoring functioning without tissue repair. Its action in response to inflammation occurs through signaling that inhibits the production of cytokine inflammatory agents, colony-stimulating factors and various chemokines in monocytes and macrophages (Salminen *et al.*, 2021).

In 2023, Martorano and co-workers observed an increase in the *TNF- α* and *IL-1 β* genes in an *in vitro* study when macrophages came into contact with AH Plus (Dentsply), when compared to Sealer 26 (Dentsply) and Sealer Plus BC (Mk Life) (Martorano *et al.*, 2023). In another study using hPDLSC, Bio-C Sealer slightly induced the production of *TNF- α* and *IL-10*, when compared to MTA Fillapex (Angelus) and PBS Cimmo HP (Cimmo Soluções em Saúde, Pouso Alegre, MG, Brazil) (Pedrosa *et al.*, 2021). In another study, Pérez-Serrano *et al.* (2021) suggested that MTA Fillapex, BioRoot RCS, AH Plus and Pulp Canal Sealer did not have inflammatory properties of hPDLSC. Similarly, another *in vitro* study also observed an increase in *IL-6* after exposure of hPDLSC to AH Plus, when compared to EndoSeal MTA (Maruchi; Wonju, Korea) (Lee *et al.*, 2019). Alchawoosh *et al.* (2023) demonstrated a significant decrease in the expression of *IL-1 β* and *IL-6* by osteoblast and macrophage cell lines

in the presence of Bio-C Sealer (Angelus) and EndoSequence BC Sealer (Innovative). In addition, in another *in vivo* study, it was demonstrated that AH Plus (Dentsply) presented a higher number of IL-6 immunostained cells, while Bio-C Sealer (Angelus) presented smaller IL-6-marked cells in subcutaneous tissue of rats (Alves *et al.*, 2020).

The introduction of bioceramics represents the most recent innovation in the development of new endodontic sealers. This development has improved several endodontic sealer properties and allowed the launch of several new sealers on the market. This highlights the need to carry out studies involving these new products. Thus, this study brought important and favorable results regarding the effects of bioceramics on hPDLSC.

CONCLUSION

Non-diluted extracts of AH Plus, Bio C-Sealer and Bio-C Sealer ion + inhibited *E. faecalis* and *C. albicans* growth and presented a bactericidal effect on *E. faecalis*. However, these extracts also showed moderate toxicity to hPDLSC, being greater in the presence of AH-plus. During the repair process, bioceramic sealers allow greater hPDLSC migration than AH plus, but this activity was not accompanied by an increase in cell proliferation. Finally, in different immunoinflammatory *in vitro* conditions, AH plus was able to upregulate the expression of *TNF- α* , *IL-6*, *IL-10*, while bioceramics maintained this expression at basal levels. Therefore, bioceramic sealers appear to be biocompatible and capable of restoring the balance of the periodontal environment under different conditions.

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).

REFERENCES

Neelakantan P, Herrera DR, Pecorari VGA, Gomes BPF. Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. *Int Endod J*. 2019;52(1):19–27. doi: 10.1111/iej.12963.

Kapralos V, Koutroulis A, Ørstavik D, Sunde PT, Rukke HV. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers against Planktonic Bacteria and Bacteria in Biofilms. *J Endod*. 2018 Jan;44(1):149-154. doi: 10.1016/j.joen.2017.08.023. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29153733.

Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent*. 2016 Jan-Mar;10(1):144-147. doi: 10.4103/1305-7456.175682. PMID: 27011754; PMCID: PMC4784145.

Zoletti GO, Siqueira JF, Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod*. (2006) 32:722–6. 10.1016/j.joen.2006.02.001

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. (2006) 32:93–8. 10.1016/j.joen.2005.10.049.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review.

Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019 May 1;24(3): e 364-e372. doi: 10.4317/medoral.22907. PMID: 31041915; PMCID: PMC6530959.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* (2006) 32:93–8. 10.1016/j.joen.2005.10.049

De Almeida J, Hoogenkamp M, Felipe WT, Crielaard W, Van Der Waal SV. Effectiveness of EDTA and modified salt solution to detach and kill cells from *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* (2016) 42:320–3.

Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of Candida Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod.* 2018; 44: 1616–1625.

Viapiana, R., Flumignan, D. L., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Camilleri, J., & Tanomaru-Filho, M. (2016). "Physicochemical and mechanical properties of a bioceramic endodontic sealer and its components." *Journal of Endodontics*, 42(4), 476-481.

Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 2002 Feb;35(2):153-8. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00459.x. PMID: 11843970.

Resende LM, Rached-Junior FJA, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CES, Silva-Sousa YTC, et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J.* 2009 Sep;42(9):785–93

Assmann E, Scarparo RK, Böttcher DE, Grecca FS. Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. *J Endod.* 2012 Feb;38(2):219-21. doi: 10.1016/j.joen.2011.10.018. Epub 2011 Dec 3. PMID: 22244640.

Al-Haddad A, Che Ab Aziz ZA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater.* 2016;2016:9753210. doi: 10.1155/2016/9753210. Epub 2016 May 3. PMID: 27242904; PMCID: PMC4868912.

Tavares L, Vasconcellos B, Maia C, Bernetti F, Sobrinho A, Tavares W. The Influence of Bioceramic Cements on the Activity of Macrophages of Different Lineages: A Laboratory Study. *J Endod.* 2024 Oct;46(10):1470-1477. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2024.06.008> Epub June 20, 2024.

Camilleri, J., Atmeh, A., Li, X. & Meschi, N. (2022) Present status and future directions: hydraulic materials for endodontic use. *International Endodontic Journal*, 55, 710–777.

Tolosa-Monfà A, Veroni A, Blasi-Cabús J, Ballester-Palacios ML, Berástegui-Jimeno E. Cytotoxicity comparison of Bio C Sealer against multiple root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2023 Feb 1;15(2):e110-e117. doi: 10.4317/jced.59868. PMID: 36911158; PMCID: PMC9994654.

Silva, E. J. N. L., Almeida, J. F. A., Neves, A. A., & Marques, M. M. (2016). "Biocompatibility, sealing ability and dentinal penetrability of a new bioceramic root canal sealer." *Journal of Endodontics*, 42(3), 467-471.

Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, Hom J, Lee FE. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol.* 2020 Oct 18;10:2458. doi: 10.3389/fimmu.2019.02458. PMID: 31681331; PMCID: PMC6813733.

Pawar SS, Pujar MA, Makandar SD. Evaluation of the apical sealing ability of bioceramic sealer, AH plus & epiphany: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2014;17:579–82; 10.4103/0972-0707.144609.

Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and Bioactive Potential of New Calcium Silicate-based Endodontic Sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod.* 2020 Oct;46(10):1470-1477. doi: 10.1016/j.joen.2020.07.011. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32682789

Zhang, H., Shen, Y., Ruse, N. D., & Haapasalo, M. (2009). "Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*." *Journal of Endodontics*, 35(7), 1051-1055.

Nagas, E., Cehreli, Z. C., Durmaz, V., & Vallittu, P. K. (2011). "Regional push-out bond strength and coronal microleakage of Resilon after different light-curing methods." *International Endodontic Journal*, 44(12), 1157-1165.

Tomás, C et al. Biocompatibility of new pulp-capping materials NeoMTA plus, MTA repair HP, and biodentine on human dental pulp stem cells. *Journal of Endodontics*, V.44, P.126–132, 2018. SCHWARTZ, R. S. Adhesive Dentistry and Endodontics. Part 2: Bonding in the Root Canal System - The Promise and the Problems: A Review. *Journal of Endodontics*, v. 32, n.12, p. 1125-1134, 2006.

Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-175.

Huang XQ, Camba J, Gu LS, Bergeron BE, Ricucci D, Pashley DH, et al. Mechanism of bioactive molecular extraction from mineralized dentin by calcium hydroxide and tricalcium silicate cement. *Dent Mater*. 2018;34(2):317-330.

AL-HABIB, Mey et al. Dental mesenchymal stem cells: dental pulp stem cells, periodontal ligament stem cells, apical papilla stem cells, and primary teeth stem cells isolation, characterization, and expansion for tissue engineering. In: *Odontogenesis*. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 59-76.

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. doi: 10.1016/0022-1759(94)90034-5. PMID: 8083535.

Xu. He *et al.*, "ROR2 Downregulation Activates the MSX2/NSUN2/p21 Regulatory Axis and Promotes Dental Pulp Stem Cell Senescence," *Stem Cells*, vol. 40, no. 3, pp. 290–302, Mar. 2022, doi: 10.1093/stmcls/sxab024.

Ok *et al.*, "Visfatin Induces Senescence of Human Dental Pulp Cells," *Cells*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/cells9010193.

Xu *et al.*, "Adipose Tissue-derived Microvascular Fragments as Vascularization Units for Dental Pulp Regeneration," *J Endod*, vol. 47, no. 7, pp. 1092–1100, Jul. 2021, doi:10.1016/j.joen.2021.04.012.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-622.

Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent*. 2016 Jan-Mar;10(1):144-147. doi: 10.4103/1305-7456.175682. PMID: 27011754; PMCID: PMC4784145.

Ricucci, D., & Siqueira, J. F. (2010). Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Int Endod J*, 43(4), 331-343. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01792.x.

Zhang, J., Wang, R., & Fan, M. (2021). Antibacterial and radiopacity properties of bioceramic sealers. *Int Endod J*, 54(2), 210-218. doi:10.1111/iej.13448.

Sanz JL, López-García S, Lozano A, Pecci-Lloret MP, Llena C, Guerrero-Gironés J, Rodríguez-Lozano FJ, Forner L. Microstructural composition, ion release, and bioactive potential of new premixed calcium silicate-based endodontic sealers indicated for warm vertical compaction technique. *Clin Oral Investig*. 2021 Mar;25(3):1451-1462. doi: 10.1007/s00784-020-03453-8. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32651645.

Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010). Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review—Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Int Endod J*, 43(11), 947-960. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01757.x.

Viana, P. S., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Faria-Júnior, N. B., Bonetti-Filho, I., & Tanomaru-Filho, M. (2021). Antimicrobial activity of root canal sealers containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, 54(6), 1109-1118.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1291-1301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028. Epub 2008 Sep 17. PMID: 18928835.

Hage W, Sarkis DK, Kallasy M, Sfeir G, Mallah M, Hachem RE, Khalil I, Zogheib C. Antimicrobial Activity of Five Calcium Silicate Based Root Canal Sealers against a

Multispecies Engineered Biofilm: An *In Vitro* Study. *J Contemp Dent Pract*. 2023 Sep 1;24(9):707-714. doi: 10.5005/jp-journals-10024-3556. PMID: 38152946.

Tavares L, Vasconcellos B, Maia C, Bernetti F, Sobrinho A, Tavares W. The Influence of Bioceramic Cements on the Activity of Macrophages of Different Lineages: A Laboratory Study. *J Endod*. 2024 Oct;46(10):1470-1477. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2024.06.008> Epub June 20, 2024.

Tolosa-Monfà A, Veroni A, Blasi-Cabús J, Ballester-Palacios ML, Berástegui-Jimeno E. Cytotoxicity comparison of Bio C Sealer against multiple root canal sealers. *J Clin Exp Dent*. 2023 Feb 1;15(2):e110-e117. doi: 10.4317/jced.59868. PMID: 36911158; PMCID: PMC9994654.

Tavares, L. C. T., Canal Vasconcellos, B. de L., Maia, C. A., Marquiore, L. F., Benetti, F., Ribeiro Sobrinho, A. P., & Tavares, W. L. F. (2024). The influence of bioceramic cements on the activity of macrophages of different lineages: A laboratory study. *Journal of Endodontics*, 20, p.n,2024.

Cheng L, Xu J, Qian YY, Pan HY, Yang H, Shao MY, Cheng R, Hu T. Interaction between mDia1 and ROCK in Rho-induced migration and adhesion of human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2017 Jan;50(1):15-23. doi: 10.1111/iej.12587. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26609804.

López-García S, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C, Rodríguez-Lozano FJ, Forner L. Comparative Cytocompatibility and Mineralization Potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials (Basel)*. 2019 Sep 22;12(19):3087. doi: 10.3390/ma12193087. PMID: 31546696; PMCID: PMC6804055.

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. doi: 10.1093/femsre/fuw007. Epub 2016 Apr 12. PMID: 27075488; PMCID: PMC4931227.

Pucinelli, C.M., Lima, R.B., Almeida, L.K.Y., Lucisano, M.P., Córdoba, A.Z., Marchesan, J.T. et al. (2022) Interferon-gamma inducible protein 16 and type I interferon receptors expression in experimental apical periodontitis induced in wild-type mice. *Int Endod J*, **55**, 1042–1052.

Liao C, Wang Y, Ou Y, Wu Y, Zhou Y, Liang S. Effects of sclerostin on lipopolysaccharide-induced inflammatory phenotype in human odontoblasts and dental pulp cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019 Dec;117:105628.

Dhar R, Kimseng R, Chokchaisiri R, Hiransai P, Utaipan T, Suksamrarn A, et al. 2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone from *Chromolaena odorata* possesses anti-inflammatory effects via inhibition of NF- κ B and p38 MAPK in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* [Internet]. 2018;40(1):43–51. Available from: <https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1405437>

Hong JH, Kim MR, Lee BN, Oh WM, Min KS, Im YG, et al. Anti-Inflammatory and Mineralization Effects of Bromelain on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation of Human Dental Pulp Cells. *Medicina (B Aires)*. 2021 Jun 8;57(6):591.

Song F, Sun H, Huang L, Fu D, Huang C. The Role of Pannexin3-Modified Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Repairing Rat Cranial Critical-Sized Bone Defects. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(6):2174–88.

Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*. 2001 Apr;22(4):199–204.

Salminen A. Increased immunosuppression impairs tissue homeostasis with aging and age-related diseases. *J Mol Med*. 2021 Jan 6;99(1):1–20.

Rodrigues LP, Teixeira VR, Alencar-Silva T, Simonassi-Paiva B, Pereira RW, Pogue R, et al. Hallmarks of aging and immunosenescence: Connecting the dots. Vol. 59, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 2021. p. 9–21.

Hall BE, Zhang L, Sun ZJ, Utreras E, Prochazkova M, Cho A, et al. Conditional TNF-alpha Overexpression in the Tooth and Alveolar Bone Results in Painful Pulpitis and Osteitis. *J Dent Res*. 2016;95(2):188-195.

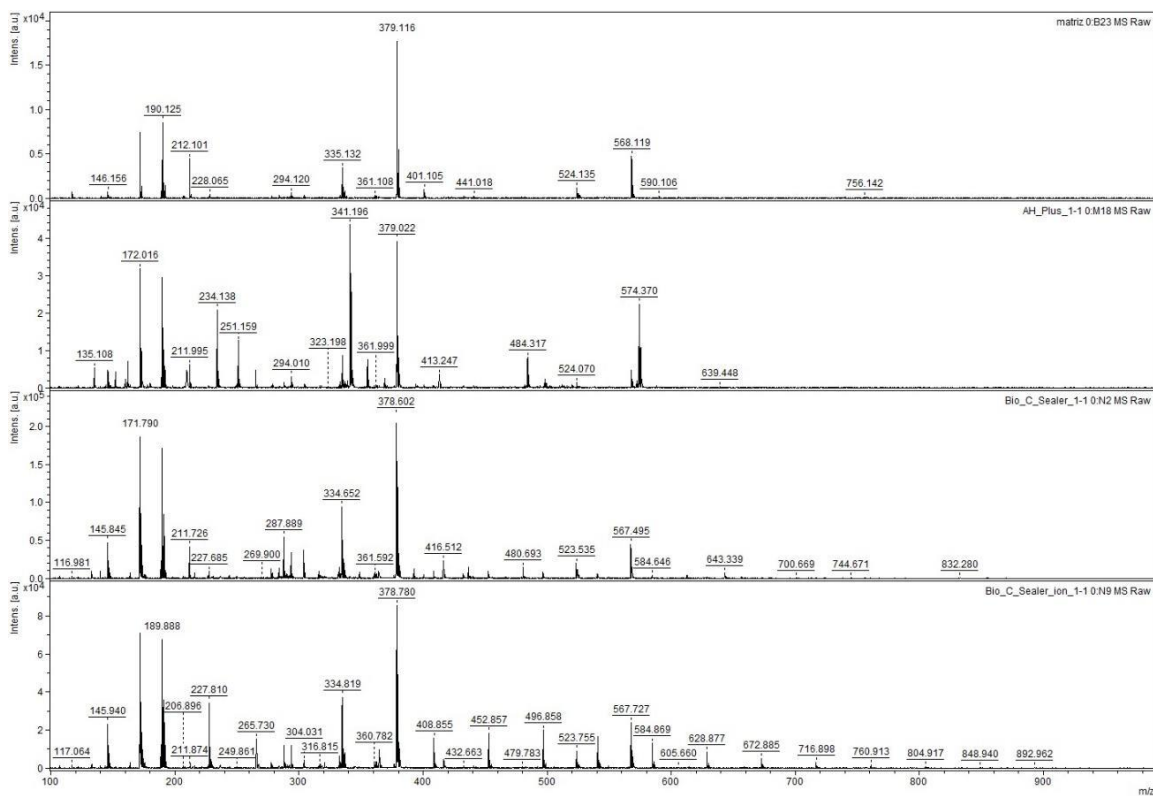
Martorano AS, Messias NS, Bighetti-Trevisan RL, de Oliveira PT, de Castro Raucci LMS, Raucci Neto W. In vitro inflammatory modulation of bioceramic endodontic sealer in macrophages stimulated by bacterial lipopolysaccharide. *Int Endod J*. 2023 Feb;56(2):213-226. doi: 10.1111/iej.13858. Epub 2022 Nov 14. PMID: 36314853.

Pedrosa MDS, Alves T, Nogueira FN, Holzhausen M, Sipert CR. Cytotoxicity and cytokine production by calcium silicate-based materials on periodontal ligament stem cells. *Braz Dent J.* 2021 May-Jun;32(3):65-74. doi: 10.1590/0103-6440202104467. PMID: 34755791.

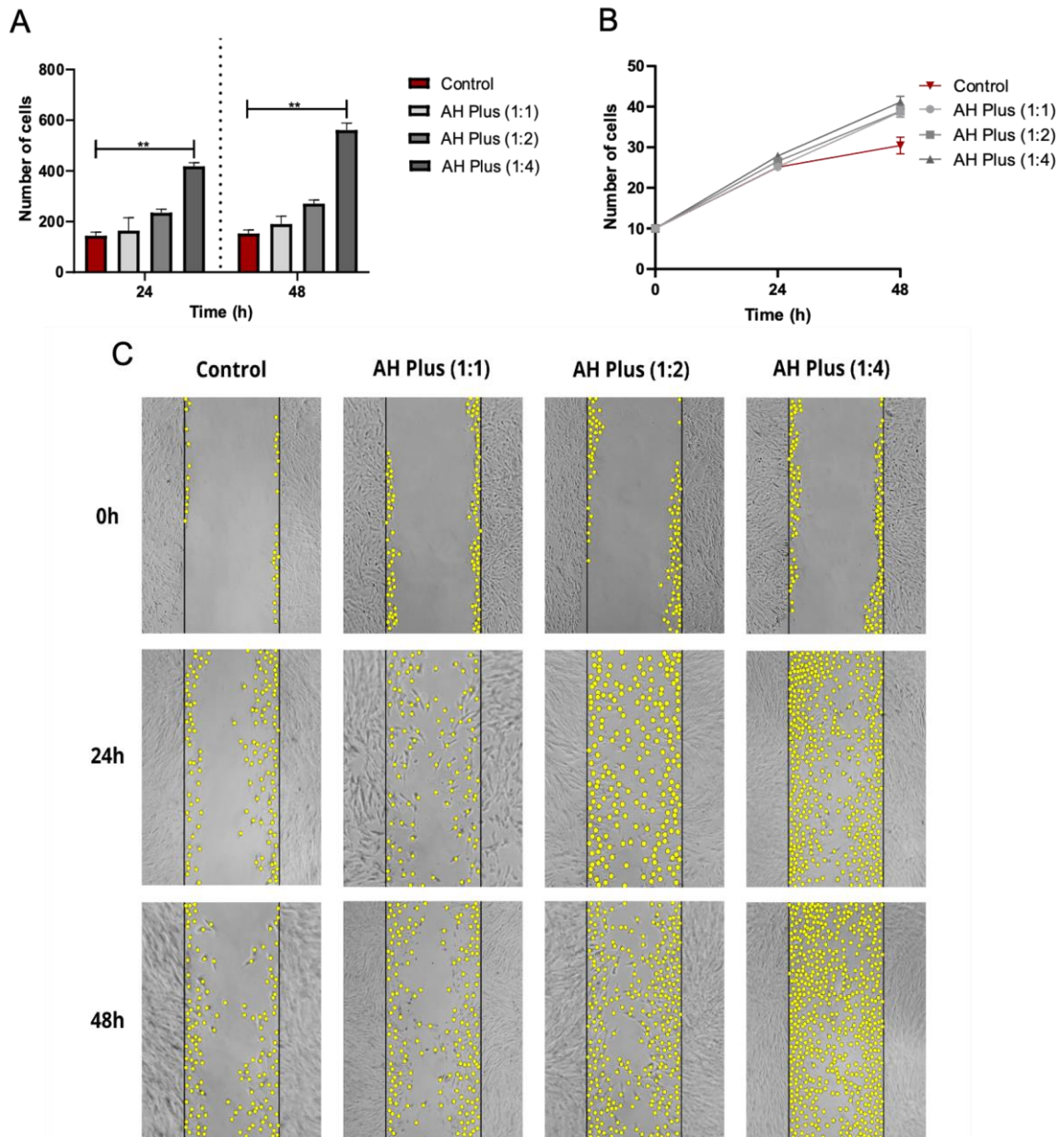
Pérez-Serrano, R.M.; Soza-Bolaños, A.I.; Castillo-Valdés, S.N.; Hernández-Valdez, G.; Mora-Izaguirre, O.; González-Dávalos, M.L.; Dammaschke, T.; Domínguez-Pérez, R.A. Endodontic set sealer eluates promote cytokine production in human mononuclear and periodontal ligament cells. *Aust. Endod. J.* 2021, 47, 415–422.

Lee JK, Kim S, Lee S, Kim HC, Kim E. In Vitro Comparison of Biocompatibility of Calcium Silicate-Based Root Canal Sealers. *Materials (Basel).* 2019 Jul 29;12(15):2411. doi: 10.3390/ma12152411. PMID: 31362338; PMCID: PMC6695985.

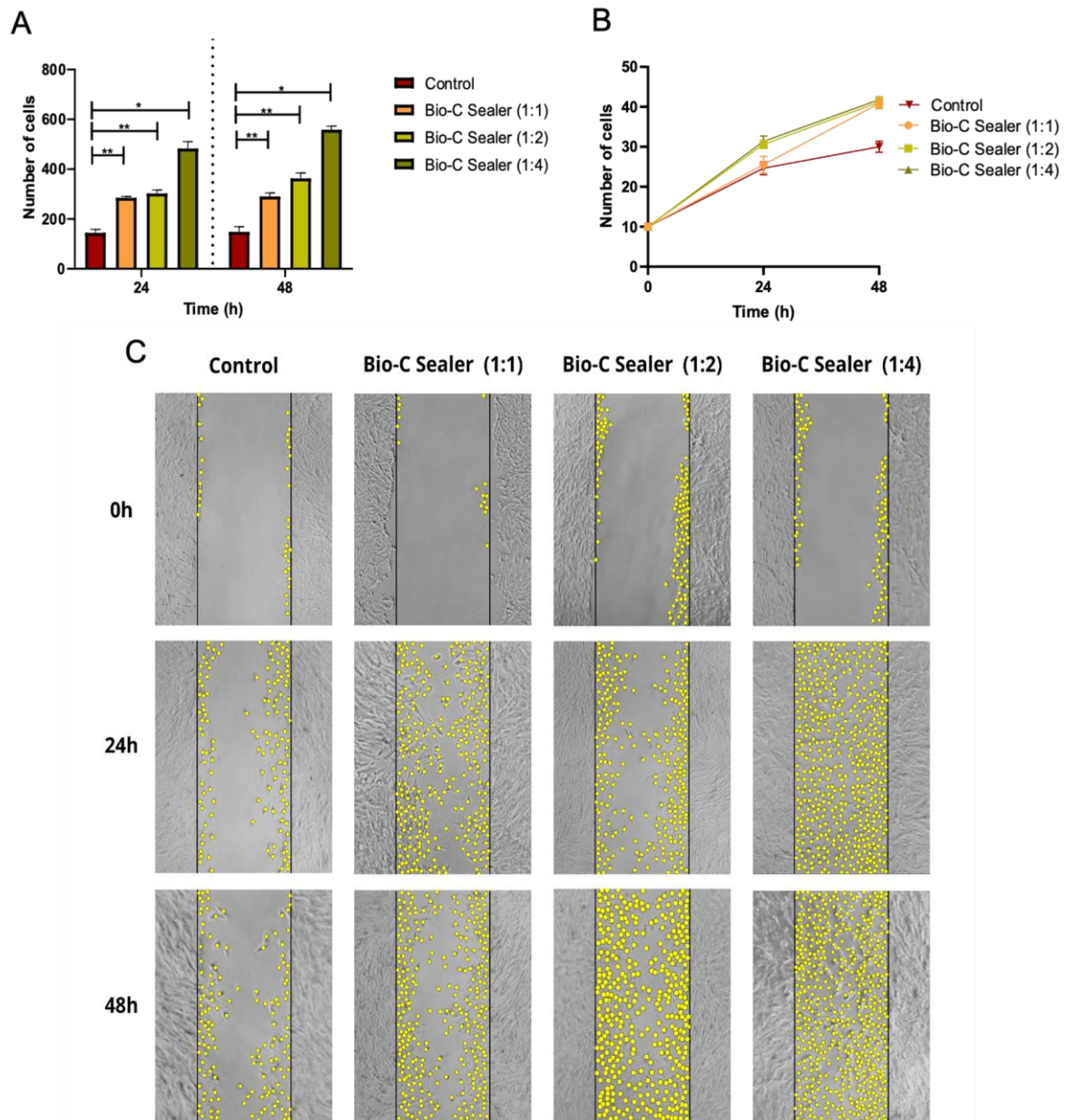
Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and Bioactive Potential of New Calcium Silicate-based Endodontic Sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod.* 2020 Oct;46(10):1470-1477. doi: 10.1016/j.joen.2020.07.011. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32682789.

SUPPLEMENTARY FIGURES:

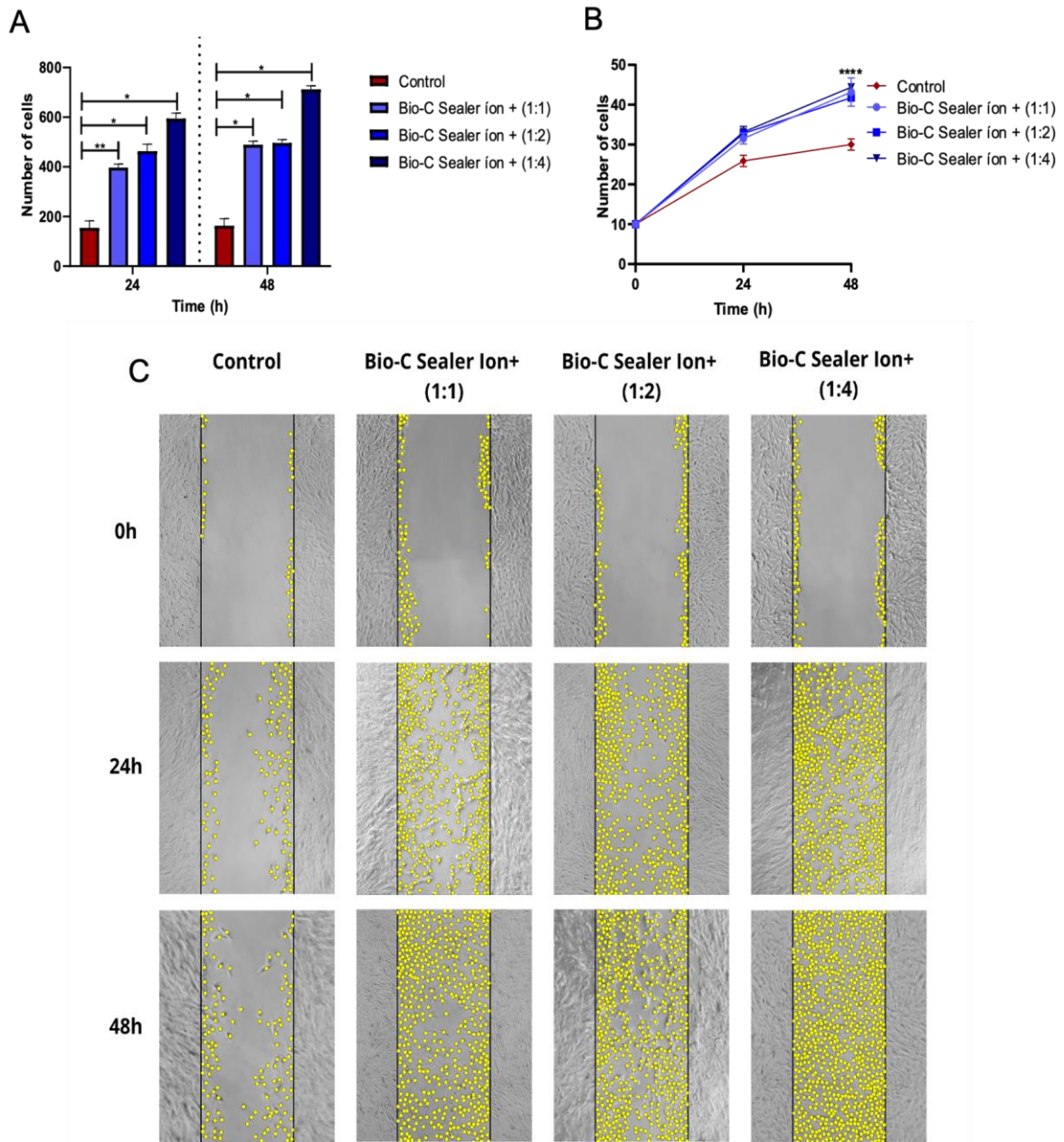
Supplementary Figure 1. MALDI-ToF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight) of pure extract from AH Plus, Bio-C Sealer and Bio-C Sealer ion +. (A) matrix, (B) AH Plus extract (1:1), (C) Bio-C Sealer (1:1), (D) Bio-C Sealer ion + (1:1).



Supplementary Figure 2. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to AH Plus (1:1, 1:2 and 1:4), after 24 and 48 h. (A) Percentage of cells migrated to the wound at 24 h and 48 h. ** $p=0.002$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of AH Plus in the extracts (1:1, 1:2 and 1:4). (C) Representative image of the cell migration test, using the scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.



Supplementary Figure 3. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to Bio-C Sealer in extracts (1:1, 1:2 and 1:4), after 24 and 48 h. (A) Percentage of cells migrated to the wound at 24 h and 48 h. * $p < 0.05$ and ** $p = 0.002$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of Bio-C Sealer in the extracts (1:1, 1:2 and 1:4). (C) Representative image of the cell migration test, using the scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.



Supplementary Figure 4. Migratory behavior of periodontal ligament cells when exposed to Bio-C Sealer ion + (1:1, 1:2 and 1:4). (A) Percentage of cells migrated to the wound at 24 h and 48 h. * $p < 0.05$, ** $p = 0.002$ and **** $p < 0.0001$, represent statistical difference by one-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Proliferation of ligament cells using the Trypan blue method, after 24 h and 48 h of Bio-C Sealer ion + in the extracts (1:1, 1:2 and 1:4). Statistical differences verified by Student's t-test * $p < 0.05$. (C) Representative image of the cell migration test, using the scratch method. Dots indicate the presence of cells in the wound. Vertical lines horizontal to the initial location where the wound was made at the starting point.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cimentos biocerâmicos, como o Bio-C Sealer (Angelus) e o Bio-C Sealer íon + (Angelus), assim como outros, representam uma inovação significativa na endodontia devido às suas propriedades de biocompatibilidade e atividade antimicrobiana. Embora o AH Plus (Dentsply) continue sendo um material amplamente utilizado, sua toxicidade relativamente maior e potencial para desencadear respostas inflamatórias intensas podem representar desvantagens em casos de extravasamento, onde o cimento pode entrar em contato direto com os tecidos periapicais.

O extravasamento de cimento obturador durante o tratamento endodôntico pode ter efeitos adversos significativos para os tecidos periapicais. Esses efeitos podem incluir respostas inflamatórias intensas, danos aos tecidos circundantes, atraso na reparação óssea, dor persistente e um risco aumentado de infecções. A gravidade desses efeitos adversos depende de fatores como o tipo de cimento utilizado, a quantidade extravasada e a resposta específica dos tecidos envolvidos. Para minimizar esses riscos e promover um reparo eficiente, é essencial selecionar materiais com menor toxicidade e utilizar técnicas de obturação precisas. Em casos de complicações severas, pode ser necessário realizar intervenções adicionais, como procedimentos cirúrgicos, para remoção do material extravasado e recuperação do paciente.

Os cimentos obturadores biocerâmicos têm se destacado por suas propriedades bioativas, favorecendo a regeneração tecidual, além de sua alta biocompatibilidade e capacidade de selamento hermético. Essas características são ideais para a obturação radicular, pois contribuem para a formação de tecido mineralizado e reduzem o risco de falhas no tratamento. O lançamento de novos materiais biocerâmicos no mercado reflete o caminho da inovação para o anseio de materiais com melhores propriedades na busca por prognósticos de maior sucesso clínico. No entanto, a diversidade de formulações exige uma avaliação rigorosa e baseada em evidências para garantir que esses materiais ofereçam benefícios reais na prática clínica.

Neste trabalho, os extratos não diluídos de AH Plus, Bio C-Sealer e Bio-C Sealer íon + inibiram o crescimento de *E. faecalis* e *C. albicans* e apresentaram efeito bactericida para *E. faecalis*. No entanto, esses extratos também apresentaram moderada toxicidade para hPDLSC, sendo esta maior, na presença do AH-plus. Durante o processo de reparo, os cimentos biocerâmicos permitiram o fechamento de feridas *in vitro*, por ação migratória de hPDLSC em maior número que as células na presença do AH plus. No entanto, essa atividade não foi acompanhada por um aumento na proliferação celular. Finalmente, em diferentes condições imunoinflamatórias *in vitro*, o cimento AH plus foi capaz de elevar a expressão das citocinas *TNF- α* , *IL-6* e *IL-10*, enquanto os cimentos biocerâmicos mantiveram essa expressão em níveis basais. Demonstrando que os cimentos biocerâmicos testados são biocompatíveis e capazes de restaurar o equilíbrio do ambiente periodontal sob diferentes condições.

Apesar dos resultados promissores, é crucial continuar avaliando estes cimentos com novos estudos, validando sua eficácia e segurança em diferentes condições. Ensaio laboratoriais e clínicos são necessários para compreender plenamente as propriedades físico-químicas, a biocompatibilidade e o comportamento biológico desses materiais, além da avaliação de uso pós-mercado, com o registro de possíveis respostas negativas.

Desta forma, conclui-se que os cimentos biocerâmicos testados ofereceram uma combinação de biocompatibilidade e eficácia antimicrobiana. Fato significativamente favorável durante o manejo de infecções endodônticas e reparo tecidual. Esta investigação será aprofundada durante futuro trabalho de Doutorado, utilizando células sanguíneas para explorar as interações entre os cimentos biocerâmicos e o sistema imunológico e sua interação com células pré-osteoclásticas.

7. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E MÉTODOS):

Abu-Odah H, Said NB, Nair SC, Allsop MJ, Currow DC, Salah MS, Hamad BA, Elessi K, Alkhatib A, ElMokhallalati Y, Bayuo J, AlKhaldi M. Identifying barriers and facilitators of translating research evidence into clinical practice: A systematic review of reviews. *Health Soc Care Community*. 2022 Nov;30(6). doi: 10.1111/hsc.13898. Epub 2022 Jul 1. PMID: 35775332.

Almeida Mm, Rodrigues CT, Matos AA, Carvalho KK, Silva EJ, Duarte MA, Oliveira RC, Bernardineli N. Analysis of the physicochemical properties, cytotoxicity and volumetric changes of AH Plus, MTA Fillapex and TotalFill BC Sealer. *J Clin Exp Dent*. 2020 Nov 1;12(11). doi: 10.4317/jced.57527. PMID: 33262872; PMCID: PMC7680565.

Aminoshariae A, Kulild JC. The impact of sealer extrusion on endodontic outcome: A systematic review with meta-analysis. *Aust Endod J*. 2020 Apr;46(1):123-129. doi: 10.1111/aej.12370. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31449355.

Ashraf H, Shafagh P, Mashhadi Abbas F, Heidari S, Shahoon H, Zandian A, Aghajanpour L, Zadsirjan S. Biocompatibility of an experimental endodontic sealer (Resil) in comparison with AH26 and AH-Plus in rats: An animal study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2022 Spring;16(2):112-117. doi: 10.34172/joddd.2022.019. Epub 2022 Oct 15. PMID: 36561386; PMCID: PMC9763656.

Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and Bioactive Potential of New Calcium Silicate-based Endodontic Sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020 Oct;46(10):1470-1477. doi: 10.1016/j.joen.2020.07.011. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32682789.

Assmann E, Scarparo RK, Böttcher DE, Grecca FS. Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. *J Endod*. 2012 Feb;38(2):219-21. doi: 10.1016/j.joen.2011.10.018. Epub 2011 Dec 3. PMID: 22244640.

Barbosa VM, Pitondo-Silva A, Oliveira-Silva M, Martorano AS, Rizzi-Maia CC, Silva-Sousa YTC, Castro-Raucci LMS, Raucci Neto W. Antibacterial Activity of a New

Ready-To-Use Calcium Silicate-Based Sealer. *Braz Dent J.* 2020 Nov-Dec;31(6):611-616. doi: 10.1590/0103-6440202003870. PMID: 33237232.

Bueno Cr, Valentim D, Marques VA, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Jacinto RC, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. *Braz Oral Res.* 2016 Jun;30(1). doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622.

Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2008;41(5):408-417.

Camilleri, Josette. Is Mineral Trioxide Aggregate a Bioceramic?. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences.* 2016;18:13. doi: 10.15517/ijds.v18i1.23482.

Dos Santos Gi, Cardoso IV, Suzin SM, Ballarin A, Lopes GC, Teixeira CS. Influence of different endodontic sealers on bond strength of fiber posts to weakened roots after resin restoration. *Clin Oral Investig.* 2021;25:4125–4135.

Eren SK, Örs SA, Aksel H, Canay Ş, Karasan D. Effect of irrigants on the color stability, solubility, and surface characteristics of calcium-silicate based cements. *Restor Dent Endod.* 2022 Feb 10;47(1). doi: 10.5395/rde.2022.47.e10. PMID: 35284325; PMCID: PMC8891465.

Guerrero Jcm, Ochoa-Rodríguez VM, Rodrigues EM, Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G. Antibacterial activity, cytocompatibility and effect of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament on osteoblast biology. *Int Endod J.* 2021 Jul;54(7):1155-1165. doi: 10.1111/iej.13502. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33638900.

Huang Xq, Camba J, Gu LS, Bergeron BE, Ricucci D, Pashley DH, et al. Mechanism of bioactive molecular extraction from mineralized dentin by calcium hydroxide and tricalcium silicate cement. *Dent Mater.* 2018;34(2):317-330.

Iftikhar S, Jahanzeb N, Saleem M, Ur Rehman S, Matinlinna JP, Khan AS. The trends of dental biomaterials research and future directions: A mapping review. *Saudi Dent J.* 2021;33:229-238. doi: 10.1016/j.sdentj.2021.01.002.

Jerez-Olate C, Araya N, Alcántara R, Luengo L, Bello-Toledo H, González-Rocha G, Sánchez-Sanhueza G. In vitro antibacterial activity of endodontic bioceramic materials against dual and multispecies aerobic-anaerobic biofilm models. *Aust Endod J.* 2022 Dec;48(3):465-472. doi: 10.1111/aej.12587. Epub 2021 Nov 6. PMID: 34741571.

Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015 Jan-Feb;5(1):1-12. doi: 10.4103/2231-0762.151956. PMID: 25767760; PMCID: PMC4355843.

Jitaru S, Hodisan I, Timis L, Lucian A, Bud M. The use of bioceramics in endodontics - literature review. *Clujul Med.* 2016;89(4):470-473. doi: 10.15386/cjmed-612. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27857514; PMCID: PMC5111485.

Kaur, Kamaldeep, Jaspal SINGH, and Manpreet KAUR. Compressive Strength of Rice Husk Ash Based Geopolymer: The Effect of Alkaline Activator. *Construction & Building Materials.* 2018;169:188-192.

Kapralos V, Koutroulis A, Ørstavik D, Sunde PT, Rukke HV. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers against Planktonic Bacteria and Bacteria in Biofilms. *J Endod.* 2018 Jan;44(1):149-154. doi: 10.1016/j.joen.2017.08.023. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29153733.

López-García S, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J, et al. Comparative Cytocompatibility and Mineralization Potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials (Basel).* 2019;12(19):3087. doi: 10.3390/ma12193087.

Miranda A, Presentación MJ, Siegenthaler R, Jara P. Effects of a psychosocial intervention on the executive functioning in children with ADHD. *J Learn Disabil.* 2013 Jul-Aug;46(4):363-376. doi: 10.1177/0022219411427349. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22064952.

Nair PNR. On the causes of failure of endodontic treatment and their prevention. In: Nair PNR, editor. *Endodontic Therapy and Outcomes.* Swets & Zeitlinger; 2002. p. 1-12.

Palma P, Rios D, Florez C, et al. Biocompatibility of Endodontic Sealers: A Systematic Review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020 Dec;108(8):3072-3081. doi: 10.1002/jbm.b.34548. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32788213.

Parisi C, Matsuoka F, Carvalho MA, et al. Evaluation of biocompatibility and antimicrobial activity of endodontic sealers: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020 Jul;108(5):1812-1823. doi: 10.1002/jbm.b.34476. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32025673.

Pio M, Santos ML, Reginato VE, et al. Effect of different endodontic sealers on the bond strength of fiber posts cemented into the root canal. *J Appl Oral Sci*. 2017 Dec;25(6):629-634. doi: 10.1590/1678-775720170231. Epub 2017 Nov 17. PMID: 29147222; PMCID: PMC5703722.

Rebouças S, Saraiva M, Lima AS, Lima IL, Cavalcanti BN, Borges G. Clinical performance of bioceramic sealers: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022 May;110(4):768-782. doi: 10.1002/jbm.b.34973. Epub 2022 Jan 7. PMID: 34963557.

Rodrigues CV, Vargas AM, de Lima CM, et al. Biocompatibility and antibacterial activity of bioceramic and epoxy resin-based sealers. *Int Endod J*. 2020 Dec;53(12):1712-1723. doi: 10.1111/iej.13319. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32884363.

Ruiz-Espíndola A, Rodríguez-Archilla A, Alarcón A, et al. In vitro evaluation of biocompatibility and osteogenic potential of different root canal sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Oct;107(7):2205-2214. doi: 10.1002/jbm.b.34365. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31154653.

Saad S, Fawzy AS, Al-Bayati MA, Ali K, Harith MA. Cytotoxicity, bioactivity, and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Biol Trace Elem Res*. 2020;198(1):244-252. doi: 10.1007/s12011-020-02096-4. Epub 2020 May 11. PMID: 32385963.

Salih AM, Mai N, Zamzam A, Ahmed S, Bozkur M. Comparative study of cytotoxicity and antimicrobial properties of different endodontic sealers. *Saudi Dent J*. 2018;30(1):9-13. doi: 10.1016/j.sdentj.2017.09.002. Epub 2017 Sep 26. PMID: 29436323; PMCID: PMC5773261.

Silva EJ, Guelmann M, Moinzadeh AT, et al. Biocompatibility and bioactivity of three endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021 Feb;109(2):283-293. doi: 10.1002/jbm.b.34508. Epub 2020 Oct 7. PMID: 32958621.

Soares RG, Oliveira I, Silva-Sousa YT, et al. Evaluation of the biocompatibility and radiopacity of new endodontic sealers: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021 Mar;109(3):447-455. doi: 10.1002/jbm.b.34514. Epub 2020 Oct 30. PMID: 33097333.

Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to dentin: A review. *J Dent*. 2003;31(6):261-275.

Teixeira CS, Almeida, GR. Comparative study of the cytotoxicity of different endodontic sealers. *J Appl Oral Sci*. 2019;27
. doi: 10.1590/1678-775720180315. Epub 2019 Jun 5. PMID: 31170608.

Timo D, Silva GA, Carvalho FN, et al. Comparative study of the biocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Dec;106(8):2966-2973. doi: 10.1002/jbm.b.34167. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30264663.

Turker S, Kucukesmen C, Karaoglanoglu S, Yavuz I, Gulaboglu MS, Bayirli G. Comparative analysis of antibacterial properties of different endodontic sealers. *Eur J Dent*. 2015;9(4):549-554. doi: 10.4103/1305-7456.166227. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26681862; PMCID: PMC4684478.

Ulusoy N, Aktas D, Tuncer M, et al. Comparison of the radiopacity and dentin bonding strength of different endodontic sealers. *J Endod*. 2015 Apr;41(4):634-8. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.009. Epub 2014 Dec 14. PMID: 25541465.

Zhang H, Shen Y, Li L, et al. Biocompatibility and degradation of endodontic sealers in human periodontal ligament cells. *J Endod*. 2018 Jun;44(6):927-934. doi: 10.1016/j.joen.2018.01.015. Epub 2018 Mar 7. PMID: 29524613.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Parecer consubstanciado de aprovação do projeto no CEP/UCB:



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das atividades antimicrobiana, imunomodulatória e anti osteoclastogênica na presença dos cimentos Bio C Sealer e Bio C Sealer íon+, em comparação ao AH plus.

Pesquisador: Taia Maria Berto Rezende

Área Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 2

CAAE: 62741822.2.0000.0029

Instituição Proponente: Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.785.653

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa do programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, a ser desenvolvido em parceria com o Curso de Odontologia, pelo estudante de mestrado Raquel Figuerêdo Ramos Faria sob orientação da professora Taia Maria Berto Rezende.

RESUMO

O tratamento endodôntico tem como desafio a máxima redução dos microrganismos e seus subprodutos do interior dos canais radiculares e suas ramificações, a fim de evitar uma reinfecção. Muitas vezes o insucesso endodôntico está intimamente ligado a presença dos patógenos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* devido a sua alta resistência pós tratamento endodôntico. Os cimentos endodônticos têm uma importante função no controle da infecção endodôntica, uma vez que são os responsáveis por sepultar as bactérias residuais nos túbulos dentinários e prevenir a entrada de fluidos ou novas bactérias nos canais radiculares. O objetivo deste estudo é investigar as atividades antimicrobianas, imunomodulatórias e anti osteoclastogênica dos cimentos Bio C Sealer e Bio C Sealer íon+, em comparação ao AH Plus. 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 das células hPDLSCs. Nesta mesma cultura celular será avaliada a produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios. Por último, a atividade antiosteoclastogênica dos cimentos será avaliada em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimuladas com ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B e fator estimulador de colônias de macrófagos.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

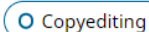
NÃO

BRASILIA, 30 de Novembro de 2022

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

ANEXO 2: Trabalho aceito para publicação durante período de mestrado na revista *Brazilian Journal of Oral Sciences* (Qualis A3 CAPES).

8675144

Raquel Figuerêdo Ramos et al.


PBMFEU PROPERTIES OF BIOCERMIC MATERIALS FOR ENDODONTIC USE: A NARRATIVE REVIEW: ...

Prezadas(s) autora(s): Raquel Figuerêdo Ramos, Larissa Barbosa de Sousa, Taia Maria Berto Rezende, Paula Ribeiro Garcia

Obrigado por enviar seu manuscrito "PBMFEU PROPRIEDADES DE MATERIAIS BIOCÉRMICOS PARA USO ENDODÔNTICO: UMA REVISÃO NARRATIVA: Material biocerâmico endodôntico" para a Revista Brasileira de Ciências Orais.

Tenho o prazer de informar que seu manuscrito foi aceito para publicação e agora será transferido para nosso departamento de produção. Criaremos uma prova, que você será solicitado a verificar, e também será solicitado a preencher uma série de formulários on-line necessários para publicação. Se precisarmos de informações adicionais suas durante o processo de produção, entraremos em contato diretamente.

Agradecemos por enviar seu manuscrito para a Revista Brasileira de Ciências Orais e esperamos que você nos considere novamente para futuras submissões.

Atenciosamente,
 Altair A Del Bel Cury
 Editor-chefe
 Revista Brasileira de Ciências Orais

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 Brasilia (UnB), Campus Univ. Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte- Brasília

Zip code: 70.910-900, DF- Brazil.

Email: taiambr@gmail.com

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

Orcid

Raquel Figuerêdo Ramos: 0009-0004-4942-2105; raquelfigueredoramos@gmail.com

Larissa Barbosa de Sousa: 0000-0002-6280-2282; lariibsousa@gmail.com

Paula Ribeiro Garcia: 0000-0001-8329-3141; paularibeirogar@gmail.com

Taia Maria Berto Rezende: 0000-0002-4148-0659; taiambr@gmail.com

Conflict of interest:

Not applicable.

ANEXO 3: Trabalhos como coautora em fase de submissão:

Artigo: *Antibiofilm, regenerative and bone homeostasis potential of the synergistic association of synoeca-MP peptide with chlorhexidine in oral cavity opportunistic infections*, em preparação final para submissão na revista *Archives of Oral Biology* (IF: 2.240, A2 CAPES).

Antibiofilm, regenerative and bone homeostasis potential of the synergistic association of synoeca-MP peptide with chlorhexidine in oral cavity opportunistic infections

Ingrid Aquino Reichert Barin¹, Johnny Carvalho da Silva², Raquel Figuerêdo Ramos², Stella Maris de Freitas Lima^{3,4}, Ana Paula de Castro Cantuária², Poliana Amanda Oliveira Silva², Elaine Maria Guará Lôbo Dantas³, Danilo César Mota Martins^{2,3}, Nelson Gomes de Oliveira Júnior¹, Osmel Fleitas Martínez¹, Jeesser Alves de Almeida⁵, Marcelo Henrique Soller Ramada¹, Octávio Luiz Franco^{1,6}, Taia Maria Berto Rezende^{1,2,7,8*}

¹Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01- Brasília – DF – Brazil.

²Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte, Brasília – DF – Brazil.

³Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01- Brasília – DF – Brazil.

⁴Curso de Odontologia, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama – Brasília – DF – Brazil.

⁵Laboratório de Pesquisa em Exercício e Nutrição na Saúde e Rendimento Esportivo – PENSARE, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande – Mato Grosso do Sul – Brazil.

⁶Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - Mato Grosso do Sul - Brazil.

⁷Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte, Brasília – DF – Brazil.

⁸Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte, Brasília – DF – Brazil.

***Corresponding author data:**

Universidade de Brasília (UnB)

Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia

Faculdade de Ciências da Saúde Campus Univ. Darcy Ribeiro s/n – Asa Norte – Brasília

Zip code: 70.910-900, DF – Brazil

Fone: +55-61-981349001

E-mail: taiambr@gmail.com

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

Artigo: *Endodontic therapy in older adults patients*, em preparação final para submissão na revista: *Clinical Oral Investigations* (IF: 1.423, B1 CAPES).

Endodontic therapy in older adults patients: a narrative review

Johnny Carvalho da Silva^a, Thaís Sousa Silva Lima^b, Raquel Figuerêdo Ramos^a, Danilo César Mota Martins^{a,c}, Stella Maris de Freitas Lima^{c,d}, Alexandre Franco Miranda^{c,d,e}, Taia Maria Berto Rezende^{a,b,f,g}

^a Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília – DF – Brazil.

^b Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília – DF – Brazil.

^c Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília – DF – Brazil.

^d Curso de Odontologia, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Brasília – DF – Brazil.

^e Pós-graduação em Gerontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília – DF - Brazil.

^f Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília – DF – Brazil.

^g Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília – DF – Brazil.

Short Title: Endodontic therapy in older adults patients

Corresponding Author: Taia Maria Berto Rezende

E-mail address: taiambr@gmail.com – Secondary e-mail: taia.rezende@unb.br

Fone: +55-61-981349001

Universidade de Brasília (UnB) - Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia

Faculdade de Ciências da Saúde Campus Univ. Darcy Ribeiro s/n – Asa Norte – Brasília

Zip code: 70.910-900, DF – Brazil

Keywords: Aging · Dental Care · Endodontic treatment · Older adults · Gerontology.