



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila Soares Lopes

**Propriedades biológicas, físicas e químicas de uma medicação intracanal
biocerâmica**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila Soares Lopes

**Propriedades biológicas, físicas e químicas de uma medicação
intra canal biocerâmica**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Coorientadora: Prof^a Dr^a Juliane Maria
Guerreiro-Tanomaru

Araraquara

2022

L864p Lopes, Camila Soares
Propriedades biológicas, físicas e químicas de uma medicação
intracanal biocerâmica / Camila Soares Lopes. -- Araraquara, 2022
139 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Paulo Sérgio Cerri
Coorientadora: Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru

1. Endodontia. 2. Imuno-histoquímica. 3. Materiais dentários. 4.
Propriedades físicas. 5. Propriedades químicas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Camila Soares Lopes

**Propriedades biológicas, físicas e químicas de uma medicação
intracanal biocerâmica**

Comissão julgadora

Tese como requisito para obtenção do grau de doutor em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Naiana Viana Viola

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato

Araraquara, 20 de maio de 2022.

DADOS CURRICULARES

Camila Soares Lopes

NASCIMENTO: 05 de março de 1989 – Alfenas - Minas Gerais

FILIAÇÃO: Ercílio Lopes e Eveline Soares Lapa Lopes

2011- 2015: Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas-Minas Gerais.

2016-2018: Mestre em Ciências Odontológicas, área de concentração em Odontologia, pela Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas-Minas Gerais.

2019-2021: Especialização em Endodontia pela Faculdade Herrero - FAEPO, Araraquara-SP.

2018-Atual: Doutoranda em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

Dedico este trabalho à minha avó Zilda Teodoro Miranda (*in memoriam*) e toda minha ancestralidade, que de alguma forma me permitiram estar aqui hoje lutando pelos meus ideais e mudando nossa história.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela sua infinita misericórdia, por ter abençoado esta jornada me dando força e coragem para enfrentar todos os obstáculos e por ter colocado pessoas que me ajudaram e me guiaram por toda trajetória. Aos amigos de luz que me acompanham nessa caminhada me protegendo e iluminando os meus passos, que nunca me desamparam.

Aos **meus pais** que me ensinaram que não há vitórias sem batalhas, sem esforço e gratidão. Que é preciso força e determinação para ir atrás dos sonhos. Obrigada por terem me dando o dom da vida e pela chance de trilharmos juntos esta caminhada. A **minha família**, tios e primos, por todo apoio e torcida. Em especial ao meu primo **Guilherme** que, mais que um primo, é parte de mim e me ensina os mais nobres dos sentimentos.

À minha madrinha **Maria de Lourdes** que me ajudou e financiou em todos os meus sonhos. Obrigada por tudo, por ser modelo de coragem, pelo apoio e por todas as orações e intenções emanadas. Ao meu tio **José Maria** que sempre frisou a importância do estudo e conhecimento na vida de uma pessoa (*in memoriam*). Aos **meus avôs e minhas avós** que de onde estiverem vibram pela minha felicidade (*in memoriam*).

À minha amiga de luz **Cristina** por todo amparo, conselhos e ajuda espiritual. Às minhas amigas de infância **Cínthia** por ter me apoiando na decisão de trilhar essa nova trajetória e ter me acompanhado nos primeiros dias aqui em Araraquara. A **Marília** por ser inspiração e me ensinar a lidar com os desafios da pós-graduação. À **Marcella, Karine e Luiza** pelo apoio e torcida de sempre.

À **Profª. Drª. Naiana Viana Viola**, não foi sorte, foi Deus. Essa vitória não seria possível sem você que foi minha inspiração desde a graduação e que foi meu maior apoio durante toda caminhada. Obrigada por ter reconhecido em mim o potencial que eu mesma nunca reconheci e por ser em minha vida o modelo de determinação, potência feminina, bondade e fé. Gratidão por ser mais que uma professora, uma eterna amiga.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**. Obrigada por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pela sua dedicação e competência, pelas vitórias e derrotas que passamos juntos durante

essa trajetória, me ensinando a levantar a cabeça e não desistir. Pela oportunidade de ter sido bolsista FAPESP, pois essa conquista não foi só minha. Minha eterna gratidão pelas experiências que passamos juntos.

À minha coorientadora **Prof^a. Dr^a. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru** por todos os ensinamentos, tanto os profissionais quanto os pessoais. Por ser essa referência feminina e profissional que enaltece conhecimento e determinação. Ao **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho** por todo acolhimento, carinho, oportunidades que me deu desde minha chegada em Araraquara. Obrigada professores pela colaboração neste trabalho e minha eterna gratidão por todo apoio e incentivo na minha vida acadêmica, foi uma honra poder conviver, trabalhar e aprender com vocês.

À **Prof.^a Dr.^a Estela Sasso Cerri** pela colaboração neste trabalho, pelos ensinamentos na parte experimental com animais mostrando conhecimento e, ao mesmo tempo, amor pelos animais. À **Prof.^a Dr.^a Gisele Faria** pela sua disposição e carinho em sempre ajudar e dividir seus conhecimentos e pela colaboração na banca de qualificação deste trabalho. Ao **Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva** muito obrigado pelas considerações e sugestões para o crescimento deste trabalho durante a banca de qualificação

Aos amigos e companheiros da pós-graduação **Fernanda, Mateus, Karina, Airton e Járder** que, além de todo apoio e amizade, ajudaram e dividiram seus conhecimentos para que eu pudesse realizar este trabalho e que muitas vezes me estimularam a continuar trabalhando com seriedade em busca dos meus objetivos.

À doutoranda **Jéssica Arielli Pradelli**, sou tão grata a Deus por ter te conhecido no meu primeiro dia em Araraquara. Obrigada por estar sempre do meu lado me apoiando, me acompanhando e sendo luz em meus dias. Sem você essa e tantas outras vitórias não seriam possíveis. Gratidão pela parceria nos momentos felizes e turbulentos.

À doutoranda **Rafaela Inada**, obrigada pela sua amizade e disposição em sempre me ajudar, por me acolher na sua casa e ser minha parceira de viagens, proporcionando grandes memórias registradas nas melhores fotos. Obrigada por me ensinar a ter paciência e calma no dia a dia.

À **Mariana Mena Barreto Pivoto-João**, você e sua família foram uns dos maiores presentes em Araraquara. Gratidão por essa amizade linda, saudades amiga!

Aos alunos da pós-graduação **Giselle, Evelin, Marcela, Cris, Hernan, Vitor e Livia** por fazerem parte desta trajetória, obrigada pela convivência e aprendizado durante esses anos e por estarem sempre dispostos a me ajudar. Aos alunos das disciplinas de Endodontia que sempre me acolheram e me respeitaram durante os estágios docentes.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP por todo apoio e suporte, em especial ao **Pedro, Sandra, Alexandre, Cristiano e Renan**. Muito obrigada por tudo!

Aos professores que aceitaram o convite para compor a banca de defesa desta tese de doutorado, **Prof. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo, Prof^a. Dr^a Raquel Assed Bezerra Segato e Prof^a. Dr^a Naiana Viana Viola** pela disponibilidade em melhorar nossos trabalhos.

Em especial aos **professores e alunos da Universidade Federal de Alfenas**, vocês foram a base de toda essa história incentivando, ajudando e sempre torcendo por mim.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr, Universidade Estadual Paulista – UNESP**, representada pelo **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** e pela **Prof.^a Dr.^a Patrícia P. Nordi Sasso Garcia**. Pela infraestrutura desta instituição que se tornou minha segunda casa, na qual, tenho muito orgulho de ter feito parte.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, FOAr/UNESP, na pessoa do Coordenador **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, pela oportunidade de se obter uma formação acadêmica de excelência e apoio.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/16848-2) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desta tese.

“Que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância, já que viver é ser livre.”
Simone de Beauvoir*

*Disponível em:<https://veja.abril.com.br/coluna/pilulas-de-sabedoria/frase-do-dia-simone-de-beauvoir-2/>.

Lopes CS. Propriedades biológicas, físicas e químicas de uma medicação intracanal biocerâmica. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a biocompatibilidade e o potencial bioativo de uma medicação intracanal biocerâmica, Bio-C Temp (BIO; Angelus, Londrina, Brasil), em comparação a medicação à base de hidróxido de cálcio, Calen (CAL; SS White, Rio de Janeiro, Brasil) implantados nos tecidos do subcutâneo de 60 ratos, durante 7, 15, 30 e 60 dias. Análise de propriedades físico-químicas, incluindo radiopacidade, pH, solubilidade, escoamento, alteração volumétrica (%) e capacidade de preenchimento foram conduzidas com as medicações BIO e o CAL. **Publicação 1:** A espessura das cápsulas, o número de células inflamatórias (CI), células imunopositivas à interleucina-6 (IL-6) e IL-10 e conteúdo de colágeno foram mensurados. Os níveis séricos da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), foram avaliados 7 e 60 dias. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste Tukey ($p \leq 0,05$). Os níveis séricos de TGO e TGP foram semelhantes ($p > 0,05$). BIO e CAL apresentaram maior espessura das cápsulas aos 30 dias reduzindo aos 60 dias. Em todos os períodos, o número de CI e células IL-6-imunopositivas foram maiores em CAL. O número de células IL-10-imunopositivas aumentou significativamente no decorrer do tempo em BIO e CAL. Aos 60 dias, BIO mostrou maior conteúdo de colágeno em comparação ao CAL ($p < 0,0001$). Os danos teciduais inicialmente provocados por BIO foram suprimidos mais rapidamente em comparação àqueles provocados por CAL, favorecendo a reparação do tecido conjuntivo. **Publicação 2:** Neste estudo, os níveis séricos de cálcio (Ca^{+2}), fósforo (P^-) e fosfatase alcalina (ALP), a imunoexpressão de osteocalcina (OCN) e osteopontina (OPN), o número de fibroblastos e a deposição de calcita amorfa foram avaliados. Os dados foram submetidos à ANOVA/Tukey ($p \leq 0,05$). Aos 7 e 15 dias, os níveis de Ca^{+2} foram maiores nas amostras do CAL enquanto que o nível de P^- foi maior aos 7 dias em BIO e CAL. O nível de ALP foi alto em BIO e CAL até os 30 dias, reduzindo significativamente aos 60 dias. Em BIO e CAL, um aumento significativo no número de fibroblastos, na imunoexpressão de IL-10, OCN e OPN foram detectados ao longo do tempo. BIO e CAL apresentaram estruturas von Kossa-positivas e birrefringentes enquanto que, no grupo controle (tubos vazios), estas estruturas não foram observadas. BIO, assim como CAL, causou aumento dos níveis séricos de ALP, enzima essencial na biomineralização, e induziu células do tecido subcutâneo a sintetizar OCN e OPN, além da deposição de calcita, indicando que BIO tem potencial bioativo. **Publicação 3:** No presente estudo, o pH, radiopacidade, escoamento, solubilidade (após 7 e 14 dias imersão em água destilada e PBS), alteração volumétrica e capacidade de preenchimento (por micro-CT) foram avaliadas. Foram aplicados os testes estatísticos ANOVA/Tukey e teste T ($p \leq 0,05$). CAL mostrou maior pH, escoamento, alteração volumétrica e solubilidade após 14 dias de imersão em água destilada e 7 e 14 dias em PBS. BIO apresentou maior radiopacidade e capacidade de preenchimento ($p < 0,05$). Apesar de a medicação biocerâmica apresentar menor perda volumétrica e capacidade de preenchimento satisfatória, evitando vazios e falhas, o Bio-C Temp mostrou menor alcalinidade do meio em comparação ao Calen.

Palavras chave: Endodontia. Imuno-histoquímica. Materiais dentários. Propriedades físicas. Propriedades químicas.

Lopes CS. Biological, physical and chemical properties of a bioceramic intracanal medication [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the biocompatibility and bioactive potential of a bioceramic intracanal medication, Bio-C Temp (BIO; Angelus, Londrina, Brazil), in comparison to a calcium hydroxide-based medication, Calen (CAL; SS White, Rio de Janeiro, Brazil) implanted into the subcutaneous tissues of 60 rats for 7, 15, 30 and 60 days. Analyses of physicochemical properties, including radiopacity, pH, solubility, flowability, volumetric change (%) and filling capacity were conducted with BIO and CAL medications. **Publication 1:** The thickness of the capsules, the number of inflammatory cells (IC), immunopositive cells for interleukin-6 (IL-6) and IL-10, and collagen content were measured. Serum glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) levels were evaluated at 7 and 60 days. The data were submitted ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$). Significant differences in the serum GOT and GPT levels were not detected ($p > 0.05$). The capsules around the BIO and CAL specimens were thicker at 30 days than at 60 days. In all periods, the number of IC and IL-6-immunopositive cells was significantly lower in BIO than in CAL specimens. In BIO and CAL specimens, the number of IL-10-immunopositive cells increased significantly over time. At 60 days, the capsules around the BIO contained greater collagen content than in CAL specimens ($p < 0.0001$). Tissue damage initially caused by BIO was suppressed more quickly compared to that caused by CAL, favoring connective tissue repair. **Publication 2:** In this study, the concentration of calcium (Ca^{+2}), phosphorus (P^-) and alkaline phosphatase (ALP) in the serum, the immunoexpression of osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN), the number of fibroblasts and the deposition of amorphous calcite were evaluated. Data were submitted to ANOVA and post-hoc Tukey test ($p \leq 0.05$). At 7 and 15 days, serum Ca^{+2} levels were higher in the CAL than in BIO samples while the P^- concentration was highest in BIO and CAL in comparison to control group (CG; empty tubes) at 7 days. The ALP level was high in BIO and CAL up to 30 days, decreasing significantly at 60 days. In BIO and CAL, a significant increase in the number of fibroblasts, in the immunoexpression of IL-10, OCN and OPN was detected over time. In contrast, OCN- and OPN-immunolabelled cells were not seen in the CG specimens. BIO and CAL specimens showed von Kossa-positive structures and birefringent deposits, while in the CG, these structures were not observed. BIO, as well as CAL, caused an increase in the serum ALP levels, an essential enzyme in biomineralization, and induced subcutaneous tissue cells to synthesize OCN and OPN, in addition to calcite deposition, indicating that BIO has bioactive potential. **Publication 3:** In the present study, pH, radiopacity, flowability, solubility (after 7 and 14 days immersion in distilled water and PBS), volumetric change and filling capacity (by micro-CT) were evaluated. ANOVA and Tukey's test and T test ($p \leq 0.05$) were applied. CAL showed higher pH, flow, volumetric change and solubility after 14 days of immersion in distilled water, and at 7 and 14 days in PBS. BIO showed greater radiopacity and filling capacity ($p < 0.05$). Despite the bioceramic medication presenting less volumetric loss and satisfactory filling capacity, avoiding voids and failures, Bio-C Temp showed lower alkalinity of the medium compared to Calen.

Keywords: Endodontics. Immunohistochemistry. Dental Materials. Physical properties. Chemical properties.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	18
3 PUBLICAÇÕES	19
3.1 Publicação 1	20
3.2 Publicação 2	49
3.3 Publicação 3	75
4 DISCUSSÃO	94
5 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICE A	113
APÊNDICE B	127
ANEXO A	138
ANEXO B	139

1 INTRODUÇÃO

A complexidade da anatomia do sistema de canais radiculares dificulta a completa limpeza e desinfecção¹. Dessa maneira, mesmo após o preparo biomecânico os micro-organismos podem permanecer no seu interior², sendo essa a principal causa de fracasso do tratamento endodôntico³. O uso da medicação intracanal é necessária para os dentes com necrose pulpar pois a microbiota já se difundiu por todo o sistema de canais e no periápice. Assim, a medicação intracanal tem o papel de complementar a desinfecção dos canais radiculares, cemento apical e túbulos dentinários¹, se difundido pela dentina em áreas onde o preparo biomecânico não pode ser realizado, estimulando a reparação tecidual e o prognóstico endodôntico⁴. Além disso, durante o intervalo entre as sessões a medicação intracanal também atua como barreira física prevenindo a reinfecção e reduzindo o risco de proliferação dos remanescentes bacterianos⁵.

As pastas à base de hidróxido de cálcio têm sido amplamente utilizadas como medicação intracanal em diferentes condições endodônticas⁶, além de serem utilizadas no intuito de otimizar a desinfecção do canais radiculares, trocas periódicas são preconizadas em casos que há necessidade de formação e reparo de tecido mineralizado⁷, após trauma dentário⁶, no controle de reabsorções radiculares, no tratamento de lesões periapicais extensas, apicificações, perfurações radiculares⁸, na endodontia regenerativa⁶ e na pulpotomia⁹.

O hidróxido de cálcio destaca-se devido ao fato de apresentar ação antimicrobiana e excelentes propriedades biológicas⁴. As pastas de hidróxido de cálcio possuem a capacidade de inativar a endotoxina bacteriana¹⁰, dissolver tecido necrótico¹¹, estimular a diferenciação de osteoblastos¹², inibir a reabsorção dentária¹³ e possui efeito biológico mineralizador^{8,13}. A ação do hidróxido de cálcio é decorrente da dissociação iônica dos íons cálcio e hidroxila^{7,8,14}, pois proporciona um ambiente alcalino que favorece sua ação antimicrobiana e efeito mineralizante¹⁴. O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio é atribuído principalmente à liberação de seus íons hidroxila em meio aquoso⁹, que se difundem através de túbulos dentinários até a superfície externa da raiz¹⁵. Estes íons são radicais livres com alto poder de reatividade¹⁶ e capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir sua atividade celular¹⁷. Além disso, os íons cálcio tem função na remoção de gás carbônico que constitui fonte respiratória

de bactérias anaeróbias¹⁸. O pH alcalino proporcionado pelo hidróxido de cálcio ao microambiente favorece o reparo e a calcificação ativa^{8,14,19}, uma vez que, neutraliza o ácido láctico dos osteoclastos e ativa fosfatase alcalina (ALP), enzima que desempenha um papel crucial na formação do tecido duro⁹. Os íons cálcio também desempenham um papel essencial na mineralização, estimulando a expressão do gene da fibronectina¹³.

Entretanto, a difusão de íons é dependente do veículo e das associações utilizadas na pasta à base de hidróxido de cálcio¹⁹. Características como a velocidade da dissociação iônica²⁰, solubilidade²¹ e difusão²² estão relacionadas ao tipo do veículo associado à medicação. Quando o hidróxido de cálcio é associado a um veículo viscoso, como propilenoglicol 400 e polietilenoglicol 400, a liberação desses íons é lenta e progressiva^{23,24}. A pasta Calen (SS White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) é uma medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associada a um veículo viscoso, o polietilenoglicol 400. Esta pasta fornece ao microambiente um pH alcalino, possui ação antimicrobiana²¹ apresentando capacidade de inativar a endotoxina bacteriana¹⁰. Além disso, a pasta Calen é biocompatível^{25,26}, com capacidade de induzir a deposição de nódulos mineralizados²⁷, bem como, a formação de tecido mineralizado¹⁹, proporcionando reparo apical satisfatório^{14,19,28}.

Embora a medicação à base de hidróxido de cálcio apresente adequadas propriedades biológicas, a permanência da pasta no interior do canal radicular por longos períodos pode afetar as propriedades mecânicas da dentina radicular por degradação do colágeno⁶. A alcalinidade do hidróxido de cálcio pode também enfraquecer a raiz²⁹ aumentando a suscetibilidade à fratura³⁰, além da medicação à base de hidróxido de cálcio ser permeável aos fluídos dos tecidos e solúvel no canal radicular³¹. Por outro lado, o hidróxido de cálcio não é efetivo contra todas as bactérias⁹, apresentando baixa efetividade frente à espécie *Enterococcus faecalis*³². Estudos têm avaliado a associação do hidróxido de cálcio com outras substâncias com o intuito de melhorar seu espectro de ação³³⁻³⁵.

Materiais endodônticos biocerâmicos, ou seja, à base de silicatos de cálcio, têm se destacado por serem bioativos³⁶, devido a interação do material com a dentina formando uma zona intermediária mineralizada na presença de umidade³⁷. Os materiais biocerâmicos são biocompatíveis³⁸⁻⁴⁴, não citotóxicos⁴⁵⁻⁴⁷, mostram potencial biotivo^{45,47} e capacidade de induzir a regeneração óssea⁴⁸, devido pelo

menos em parte ao pH alcalino proporcionado ao meio e a liberação de íons cálcio⁴⁹. Os materiais biocerâmicos também apresentam ação antibacteriana^{45,47,50} e tomam presa em ambiente úmido⁵¹. Os materiais à base de silicato de cálcio são rotineiramente utilizados na Endodontia em procedimentos envolvendo a regeneração pulpar e o reparo de tecidos duros, como material reparador durante o capeamento pulpar, pulpotomia, apexificação, reparo de perfuração e retrobrutação, bem como, na obturação dos canais radiculares⁵².

Atualmente existe um interesse crescente no desenvolvimento de novos materiais endodônticos à base de silicato de cálcio⁵³. Deste modo, a Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A (Londrina, Brasil)⁵⁴ desenvolveu um novo medicamento endodôntico biocerâmico, o Bio-C Temp. Esta medicação é uma pasta, pronta para o uso, à base de silicatos de cálcio associada aos radiopacificadores tungstato de cálcio e óxido de titânio; esse medicamento biocerâmico também apresenta na sua composição o aluminato de cálcio, óxido de cálcio e resina base como veículo.

O Bio-C Temp é indicado como um curativo intracanal no tratamento endodôntico, retratamento, em dentes com rizogênese incompleta, perfurações e reabsorções externas e internas⁵⁴. De acordo com o fabricante, o Bio-C Temp dispensa e/ou elimina a necessidade de novas aplicações, constituindo-se numa vantagem em relação às medicações à base de hidróxido de cálcio que exigem trocas frequentes⁵⁴.

O Bio-C Temp deve ser removido do canal radicular após algum tempo por meio de protocolos semelhantes aos usados para as pastas à base de hidróxido de cálcio⁵⁴. As partículas de silicato de cálcio, presente na pasta biocerâmica, em ambiente úmido hidratam formando o silicato de cálcio hidratado na superfície da partícula. No entanto, as cadeias poliméricas presentes no material dificultam a ligação das partículas hidratadas e, em consequência, impossibilita que a medicação tome presa⁵³.

Este novo medicamento à base de silicato de cálcio mostrou efeito não citotóxico em extratos mais diluídos associados à cultura de fibroblastos⁵³, células da polpa dental humana (hDPCs)^{55,56} e células osteoblásticas humanas (Saos-2)²⁷. O Bio-C Temp induziu atividade osteogênica em ensaio *in vitro* em células da linhagem Saos-2, demonstrada pela deposição de nódulos mineralizados e atividade de ALP semelhante às medicações à base de hidróxido de cálcio, UltraCal XS (UltraDent

Product, Inc., Indaiatuba, SP, Brasil) e Calen. No entanto, com relação à atividade antimicrobiana, o Bio-C Temp apresentou menor efetividade contra *E. faecalis* na forma planctônica e de biofilme por meio do teste de contato direto e de cristal violeta em comparação as medicações à base de hidróxido²⁷.

Embora o meio aquoso contendo o Bio- C Temp tenha apresentado pH alcalino, o valor deste foi inferior ao Ultracal XS, uma medicação à base de hidróxido de cálcio associada a um veículo aquoso, nos períodos de 1, 24 e 72 horas. No entanto, diferenças significantes nos valores do pH das soluções contendo Bio-C Temp e Ultracal XS não foram detectadas aos 7 dias. A liberação de cálcio do material biocerâmico para o microambiente foi menor do que a pasta de hidróxido de cálcio apenas no período de 24 horas. Baseado nas normas *International Organization for Standardization* (ISO 6876:2016), o Bio-C Temp apresentou maior radiopacidade (cerca de 7 mm/Al) e ambos os materiais não promoveram penetração nos túbulos dentinários como foi demonstrado pela análise com microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)⁵³.

Quando comparado aos materiais reparadores biocerâmicos, Bio-C Repair (Angelus, Londrina - PR, Brasil) e Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fossés, France), o Bio-C Temp forneceu soluções com alcalinidade semelhante, porém maior liberação de cálcio após 24 horas de imersão. Utilizando dentes bovinos, os autores observaram que os três materiais foram associandos com a descolaração dental e a medicação biocerâmica mostrou menor radiopacidade que o Bio-C Repair que apresenta na composição óxido de zircônia como radiopacificador²². Estudo similar em dentes bovinos demonstrou que o Bio-C Temp apresentou maior radiopacidade e promoveu menor alteração de cor dentinária em comparação ao Ultracal XS e ao material reparador MTA Flow (UltraDent Product, Inc., Indaiatuba, SP, Brasil)⁵⁵.

Uma vez que a medicação entra em íntimo contato com tecidos perirradiculares, sua composição química e os compostos tóxicos liberados podem interferir na resposta inflamatória e, conseqüentemente, no processo de reparo⁵⁷. O implante de materiais dentários no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos é um método recomendado pela ISO 10993⁵⁸ que permite avaliar a reação inflamatória em resposta aos materiais bem como permite avaliar as cascatas de eventos que culminam na regressão do processo inflamatório e a sua substituição por tecido conjuntivo denso, contendo fibroblastos e fibras colágenas^{40,42}. Assim, a análise em

diferentes períodos permite avaliar a intensidade do processo inflamatório, os principais tipos celulares e se o mesmo persiste ao longo do tempo, constituindo-se num parâmetro de avaliação das propriedades biológicas dos materiais dentários⁵⁹.

Os materiais endodônticos podem liberar substâncias que estimulam a migração e a diferenciação das células inflamatórias, induzindo também a produção de citocinas moduladoras da inflamação, tais como a interleucina 6 (IL-6)^{40-44,60,61}. Esta citocina tem se constituído num parâmetro de análise do processo inflamatório, pois apresenta uma correlação direta com a regressão do processo inflamatório nas cápsulas formadas em resposta aos implantes de materiais endodônticos³⁹. Em contrapartida a IL-10 apresenta uma marcante função anti-inflamatória mostrando a capacidade de inibir a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e IL-8^{62,63}. Portanto, a detecção da IL-10 possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados na regressão da resposta inflamatória induzida pelos biomateriais endodônticos⁶⁴.

Além disso, a neoformação de constituintes da matriz dos tecidos mineralizados pode ser avaliada por imuno-histoquímica para detectar as diversas proteínas existentes, como osteocalcina e osteopontina⁶⁵. Estudos relataram que materiais contendo silicato de cálcio induziram a imunoexpressão de osteopontina^{66,67} e osteocalcina^{38,43,66,67} nas células do tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos. Adicionalmente, estudos reportaram que materiais à base de silicato de cálcio induzem a precipitação de cálcio nas cápsulas formadas adjacentes aos implantes no subcutâneo de ratos, evidenciado pelo método histoquímico de von Kossa^{38,41-44,60}.

A implantação no subcutâneo de ratos também permite investigar se os materiais odontológicos podem promover alterações sistêmicas, uma vez que estes materiais liberam substâncias que podem por via sanguínea podem atingir órgãos intimamente associados à manutenção do metabolismo do organismo⁴⁴. A dosagem dos níveis séricos das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) podem ser utilizadas como parâmetros bioquímicos da função hepática⁶⁸. Além disso, constituintes inorgânicos de tecidos mineralizados, incluindo cálcio (Ca^{+2}) e fósforo (P^-), e ALP, uma enzima envolvida na mineralização, podem ser medidos por meio da coleta de sangue no intuito de investigar se os materiais endodônticos causam alterações nesses parâmetros associados à biomineralização⁶⁶.

Por outro lado, a reação tecidual (biocompatibilidade e potencial bioativo) de um material odontológico, incluindo a medicação intracanal, está intimamente associada às suas propriedades físico-químicas. Deste modo, a investigação destas propriedades, dentre elas o pH, liberação de íons cálcio e solubilidade são relevantes para prever o comportamento clínico das medicações²¹. É importante que a medicação se difunda pelos túbulos dentinários e ramificações laterais do sistema de canais radiculares, preenchendo todo o canal e agindo por contato direto ou indireto nos túbulos dentinários⁶⁹. A radiopacidade da medicação intracanal é importante para avaliar se o preenchimento dos canais radiculares ocorreu satisfatoriamente, além de permitir o acompanhamento clínico do tratamento²¹.

A microtomografia computadorizada (micro-CT) é uma ferramenta de análise tridimensional não destrutiva⁷⁰ que complementa o teste convencional de análise de solubilidade permitindo uma análise volumétrica (em mm³) dos materiais e a capacidade de preenchimento dos materiais⁷¹ por meio da análise da interface dentina e material, uma vez que, a alta resolução, permite observar a presença de defeitos e espaços vazios⁷². Essas análises são importantes, pois a perda volumétrica do material, bem como, a presença de espaços vazios após o preenchimento do canal impede o contato direto do material com as bactérias prejudicando a ação antimicrobiana, além de permitir a reinfecção bacteriana no interior do canal radicular²¹.

Portanto, a total eliminação de micro-organismos resistentes continua sendo um grande desafio na terapia endodôntica, sendo fundamental a busca por medicamentos eficazes⁷³. Considerando que é essencial o conhecimento das propriedades físico-químicas para a escolha de uma de medicação intracanal²³ e o possível contato de um material endodôntico com os tecidos periapicais, é importante que as propriedades físico-químicas e biológicas de novos materiais, ou modificações na composição de materiais já conhecidos, sejam avaliadas por diferentes metodologias^{74,75}.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a resposta sistêmica, local e o potencial bioativo de uma medicação intracanal biocerâmica, Bio-C Temp (Angelus, Londrina, Brasil), bem como avaliar algumas propriedades físicas e químicas desta medicação. Os resultados obtidos desta pasta biocerâmica foram comparados ao Calen (SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brasil), uma pasta à base de hidróxido de cálcio, usada rotineiramente na clínica endodôntica.

Publicação 1: Avaliação da biocompatibilidade da medicação intracanal, Bio-C Temp, em comparação a pasta Calen. Para atingir o objetivo foram realizadas as análises morfológicas, morfométricas e reações imuno-histoquímicas para detecção da interleucina-6 e interleucina-10 nas cápsulas formadas ao redor dos implantes. Adicionalmente, mensurações dos níveis séricos de TGO e TGP foram realizadas para verificar se as medicações induzem alterações nas enzimas hepáticas.

Publicação 2: Avaliar se o Bio-C Temp promove alterações nas concentrações de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina no soro após a implantação no tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos. Além disso, o potencial bioativo do Bio-C Temp foi avaliado nas cápsulas formadas ao redor dos implantes. Esta hipótese foi avaliada por meio da detecção imuno-histoquímica de osteocalcina e de osteopontina, reação de von Kossa e da análise de cortes não corados sob luz polarizada.

Publicação 3: Avaliação do pH, radiopacidade, escoamento, solubilidade, bem como, alteração volumétrica e capacidade de preenchimento da medicação intracanal Bio-C Temp em comparação ao Calen.

3 PUBLICAÇÕES

O presente trabalho resultou em três artigos.

O artigo 1 intitulado “Hepatic enzymes and immunoinflammatory response to Bio-C Temp bioceramic intracanal medication implanted into the subcutaneous tissue of rats”, publicado no “*Scientific Reports*”. Lopes CS, Delfino MM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Hepatic enzymes and immunoinflammatory response to Bio-C Temp bioceramic intracanal medication implanted into the subcutaneous tissue of rats. *Sci Rep*. 2022; 12(1): 2788.

O artigo 2 intitulado “Bioactive potential of Bio-C Temp demonstrated by systemic markers of mineralization and immunoexpression of bone proteins after implantation in rat subcutaneous tissues” foi redigido para submissão no “*Journal of Biomedical Materials Research Part B*”. (Em revisão pelos autores para submissão).

O artigo 3 intitulado “Physicochemical properties of a calcium silicate intracanal medication: Bio-C Temp” será submetido a publicação no “*International Endodontic Journal*”.

3.1 Publicação 1*

Hepatic enzymes and immunoinflammatory response to Bio-C Temp bioceramic intracanal medication implanted into the subcutaneous tissue of rats

Camila Soares Lopes¹, Mateus Machado Delfino¹, Mário Tanomaru-Filho¹, Estela Sasso-Cerri², Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru¹, Paulo Sérgio Cerri^{2*}

¹Department of Restorative Dentistry, Dental School – São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

²Laboratory of Histology and Embryology - Department of Morphology, Genetics, Orthodontics and Pediatric Dentistry - Dental School – São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

Running title: *In vivo* evaluation of Bio-C Temp

* **Address for all correspondence:**

Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Laboratory of Histology and Embryology – Dental School

São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

Phone: +55 16 33016497

Fax: +55 16 33016433

e-mail: paulo.cerri@unesp.br

* Artigo escrito segundo normas do periódico *Scientific Reports*. Artigo aceito em 5 de janeiro de 2022.

ABSTRACT

This study evaluated the tissue reaction and serum glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) levels of a new bioceramic intracanal medicament, Bio-C Temp (BIO). The biological properties of BIO were compared with calcium hydroxide-based intracanal medicament (Calen; CAL), used as gold pattern. Polyethylene tubes filled with BIO or CAL, and empty tubes (control group, CG) were implanted into subcutaneous tissue of rats. After 7, 15, 30 and 60 days, the samples were embedded in paraffin for morphological, quantitative and immunohistochemistry analyses. At 7 and 60 days, blood samples were collected for analysis of serum GOT and GPT levels. The data were submitted to two-way ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$). No significant difference was detected in serum GOT and GPT levels among BIO, CAL and CG specimens. In all periods, BIO specimens exhibited lower number of inflammatory cells and immunoexpression of IL-6, a pro-inflammatory cytokine, than CAL specimens. The reduction of these parameters was accompanied by significant increase in the collagen content and in the immunoexpression of IL-10, a cytokine involved in the tissue repair, over time. Biochemical analysis suggests that Bio-C Temp had no hepatotoxicity effect. Moreover, histological findings indicate that Bio-C Temp is biocompatible.

INTRODUCTION

The complexity of the root canal system can interfere with its complete cleaning and disinfection and even after biomechanical preparation, microorganisms can remain in the root canal system, leading to endodontic treatment failure¹. Therefore, the use of intracanal medication may enhance the disinfection of root canal system, apical cementum and dentinal tubules². Moreover, intracanal medication acts as a physical barrier preventing reinfection and reducing the risk of bacteria proliferation³.

The calcium hydroxide pastes have been widely used as an intracanal medication acting as a complement to biomechanical preparation due to its antimicrobial potential², ability to dissolve organic tissue⁴, stimulate the osteoblast proliferation⁵, and induction of mineralized tissue formation⁶. There is the search for new medications or associations with the materials routinely used in order to enhance the action of the intracanal dressing⁷.

The bioceramic material has been used due to excellent biocompatibility and bioactive potential of the calcium silicate⁸, which promotes the deposition of hydroxyapatite on its

surface⁹. The bioactivity of bioceramic materials favor the survival and differentiation of osteoblasts, cells actively involved in the periapical repair¹⁰ enabling the formation of mineralized tissue¹¹.

Thus, a bioceramic intracanal medication, Bio-C Temp, has been developed by Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brazil), ready to use. The Bio-C Temp is indicated for conventional endodontic treatment, endodontic retreatment, apexification and endodontic regeneration¹². According to the manufacturer, Bio-C Temp contains calcium silicates associated with calcium tungstate and titanium oxide radiopacifiers, besides calcium aluminate, calcium oxide and base resin. This new intracanal medication has shown acceptable cell viability¹²⁻¹⁴ and osteogenic activity *in vitro*¹², however, there are no *in vivo* studies on the biological properties of this material. The implantation into subcutaneous tissues of rats is a method, which has been widely used to analyze the tissue response to the materials as well as the type and extent of the inflammatory reaction¹⁵.

The aim of this study was evaluate whether Bio-C Temp induces changes in the serum glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) levels and the tissue reaction induced by this bioceramic intracanal medication in the subcutaneous connective tissue in different time points. The biological response induced by Bio-C Temp was compared with a calcium hydroxide-based paste (Calen, SS.White, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), used as gold pattern. The null hypothesis was that Bio-C Temp does not present better biological properties when compared with the calcium hydroxide paste.

RESULTS

Serum hepatic enzymes level

As shown in the Figs. 1A and 1B, significant differences in serum TGO and TGP concentrations among BIO, CAL and CG specimens ($p > 0.05$) were not observed, at 7 and 60 days. Moreover, from 7 to 60 days, no significant difference was also seen in serum TGO and TGP levels in all groups ($p > 0.05$).

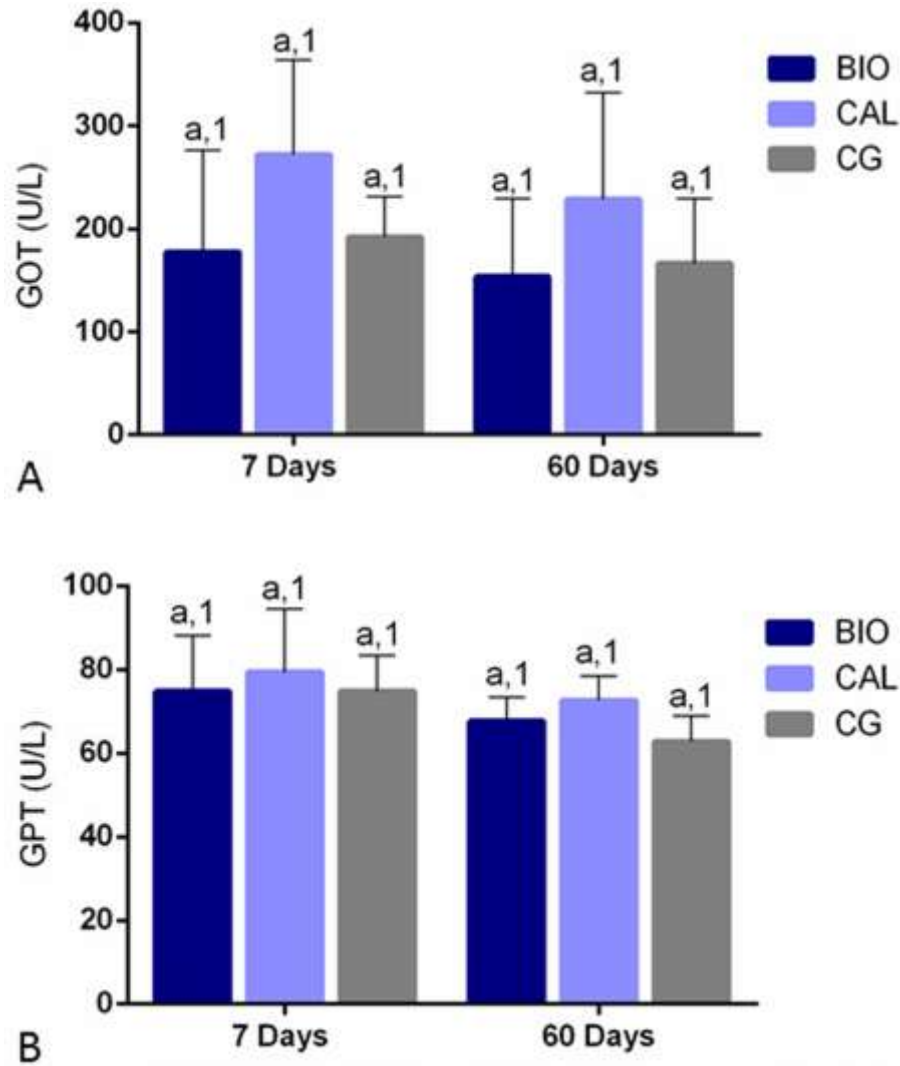


Figure 1 (A-B) – The serum levels of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT - Fig. A) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT – Fig. B) in Bio-C Temp, Calen and Control groups at 7 and 60 days. In rats with intracanal medication, the GOT and GPT levels were similar to CG rats. From 7 to 60 days, significant differences are not seen in the serum GOT and GPT levels. Values expressed as mean $\pm$ SD. Tukey's test ($p \leq 0.05$). In each period, superscript letters indicate the analysis among groups; same letters = no significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; same numbers = no significant difference.

Morphological findings, capsule thickness and numerical density of ICs

In all groups, well-defined capsules were around the implants (Fig. 2A-L). In BIO and CAL there was an increase in the thickness of the capsules over time. Moreover, material particles were often observed dispersed by the capsules (Fig. 2A, B, D, E, G, H, J and K). At 7 days, necrotic areas were observed in the surface of capsules of BIO and CAL (Fig. 2A-B); in the CAL, necrotic areas were seen at all periods. The CG specimens were surrounded by thin capsules (Fig. 2 C, F, I and L).

According to Figure 2M, no significant difference was found in the capsule thickness between BIO and CAL specimens at 7 days ($p = 0.98$). The capsules of BIO specimens were significantly thicker than in CAL ($p < 0.0001$) at 15, 30 e 60 days. In BIO and CAL specimens, a significant increase in the capsule thickness was verified at 30 days, but a significant reduction was noticed at 60 days ($p < 0.0001$). At all periods, GC specimens exhibited the lowest values in the capsule thickness and a significant reduction was detected over time ($p < 0.0001$).

At 7 days, the capsules of all groups contained several ICs, mainly macrophages and lymphocytes, and few fibroblasts (Figs. 3A-C). However, significant differences were observed among the groups ($p < 0.0001$); the lowest values of ICs were obtained in CG capsules while the highest values were found in CAL specimens (Figs. 3A-M). In BIO and CG, a significant reduction in the number of ICs was observed over time ($p < 0.0001$). Although the number of ICs reduced significantly in CAL specimens from 7 to 15 days ($p < 0.0001$), no significant difference ($p = 0.61$) was detected between the periods of 15 and 30 days. At 60 days, the number of ICs in all groups was lower ($p < 0.0001$) than other time points (Fig. 3M).

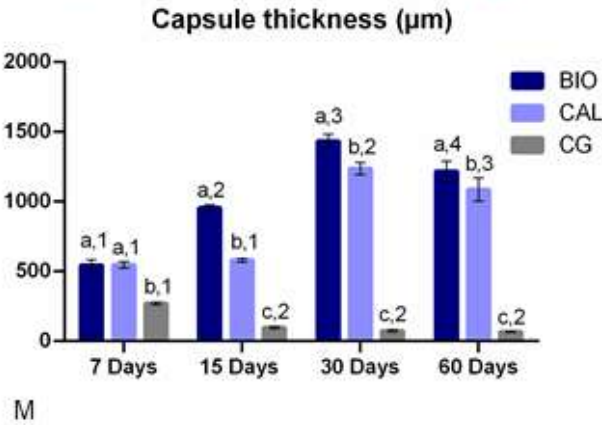
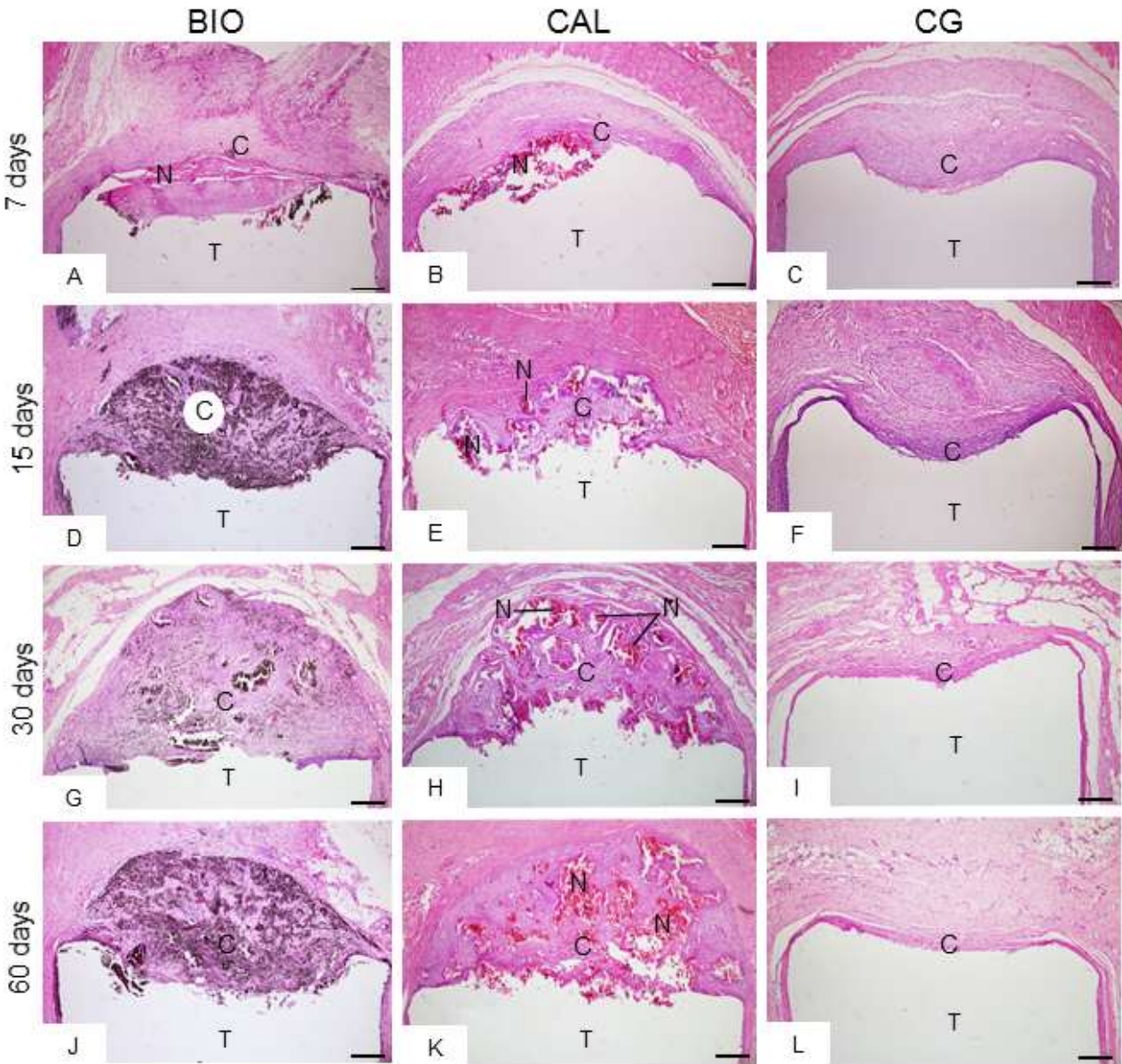
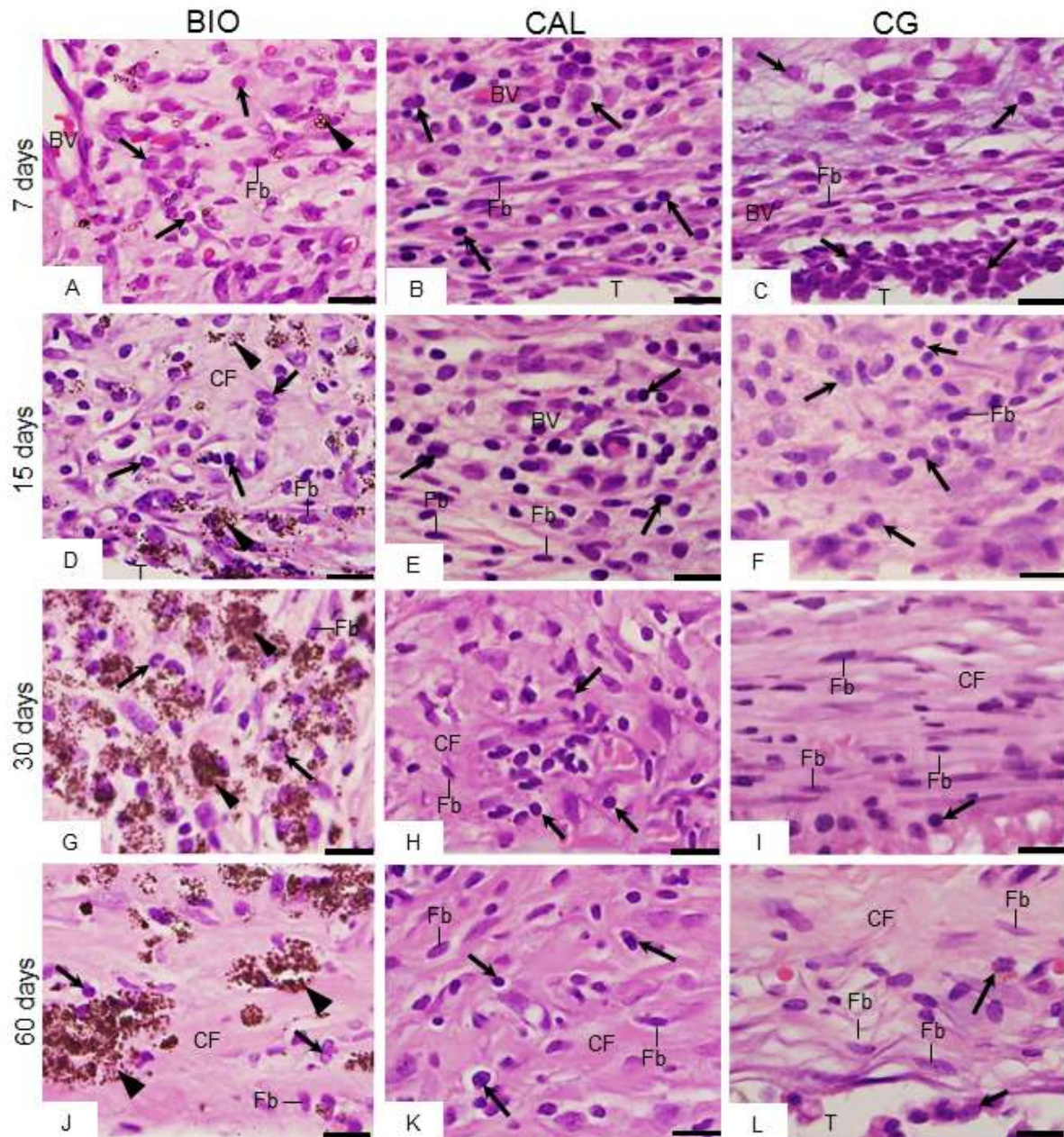
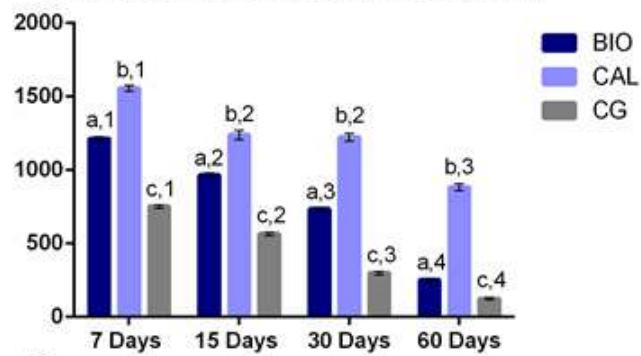


Figure 2 (A-L) – Light micrographs of sections showing an overview of capsules adjacent to the opening of the implanted tubes (T), at 7 (Figs. A-C), 15 (Figs. D-F), 30 (Figs. G-I) and 60 (Figs. J-L) days. In all periods, well-defined capsules (C) are seen. At 15, 30 and 60 days, thick capsules are adjacent to the BIO (D, G and J) and CAL (E, H and K) groups. In BIO specimens, several particles (brown/black colour) are dispersed throughout the capsules (C). In all periods, thin capsules are observed in the CG. N, necrosis area. HE. Bars: 152 μ m.

Figure 2M – The graphic shows the values (expressed as mean $\pm$ standard deviation) of capsule thickness (in μ m) of Bio-C Temp (BIO), Calen (CAL) and Control (GC) groups at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).



Number of inflammatory cells (mm^2)



M

Figure 3 (A-L) – Light micrographs showing the innermost portion of capsules. Inflammatory cells (arrows), fibroblasts (Fb), collagen fibers (CF) and material particles (arrowheads) are seen in the capsules. At 15, 30 and 60 days, the capsules of the control group exhibit few inflammatory cells (arrows) and a gradual increase in fibroblasts (Fb) and collagen fibers (CF). BV, blood vessels; HE. Bars: 18 μ m. **Figure 3M** – The graphic shows the values (expressed as mean $\pm$ standard deviation) of the numerical density of inflammatory cells in the capsules. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Immunohistochemical detection of IL-6

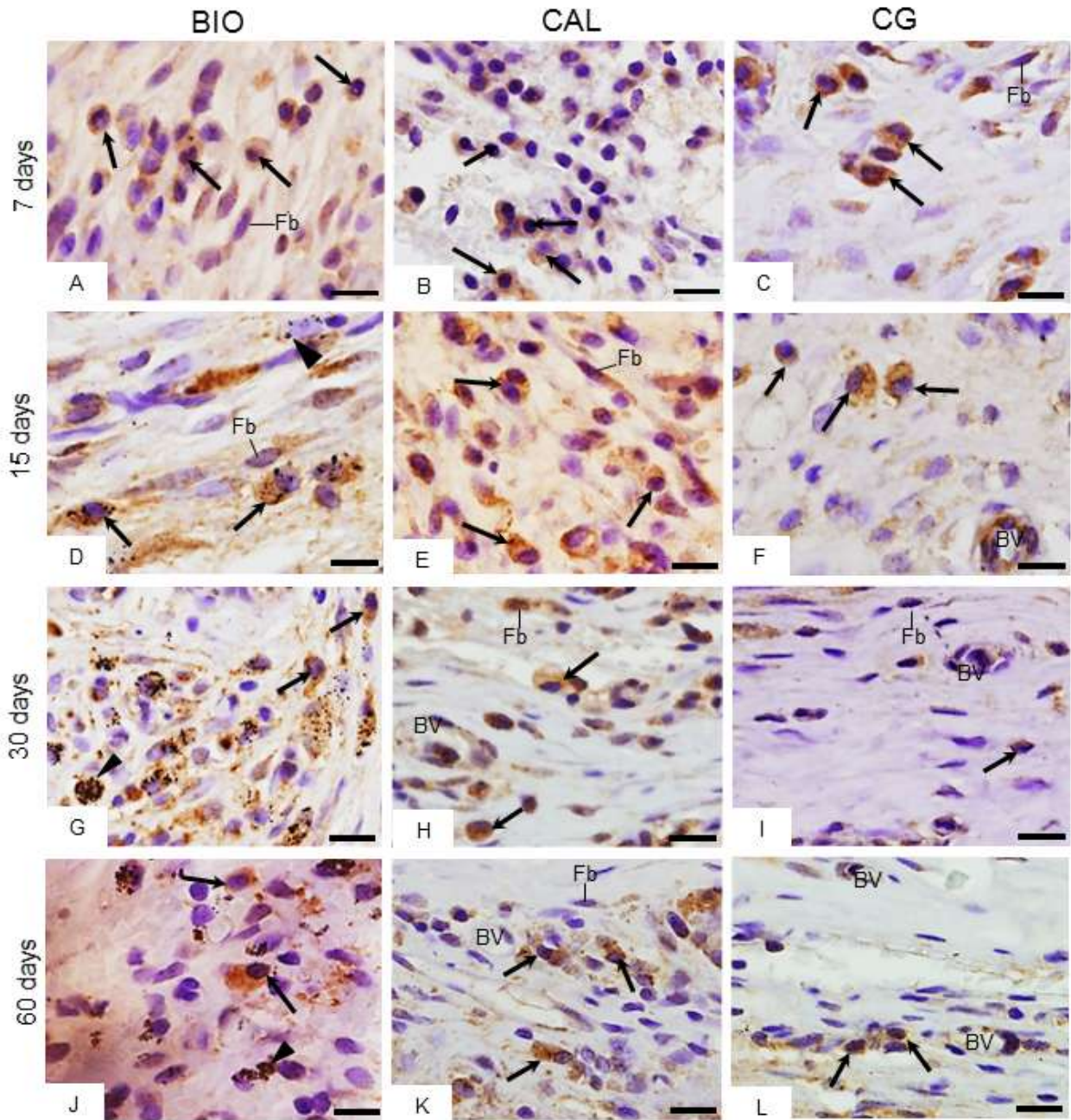
The capsules of all groups showed ICs, particularly neutrophils and macrophages, containing strong immunolabelling in their cytoplasm (brown-yellow colour) in all periods. Moreover, some immunolabelled fibroblasts were also observed (Figs. 4A-L). A reduced immunoexpression was observed in the capsules of CG, particularly at 30 and 60 days (Figs. 4 C, F, I and L).

The quantitative analysis (Fig. 4M) revealed that the number of IL-6-immunostained cells decreased significantly from 7 to 60 days ($p < 0.0001$), in all groups. In all periods, the number of immunolabelled cells was significantly lower around the BIO specimens than in CAL ($p < 0.0001$) while the lowest values were observed in the capsules of CG.

Immunohistochemical detection of IL-10

In all periods, the immunohistochemistry reaction for detection of IL-10 revealed immunolabelled cells (brown-yellow colour) in the capsules of all groups. Although some ICs and fibroblasts exhibited immunolabelling for IL-10, strong immunolabelling in the cytoplasm of mast cells was often seen in the capsules of all groups (Figs. 5A-L).

According to Figure 5M, the lowest values of IL-10-immunolabelled cells were found in all groups at 7 days. From 7 to 60 days, the immunoexpression of IL-10 increased significantly in all groups ($p < 0.0001$). At 7 days, no significant difference among the groups was detected ($p > 0.05$). At 15, 30 and 60 days, the number of IL-10-immunolabelled cells was significantly lower in CG specimens than in BIO and CAL groups ($p < 0.0001$). On 15th day, the highest values were found in BIO specimens while, at 30 and 60 days, the highest values were observed in the CAL specimens ($p < 0.0001$).



Number of IL-6-immunolabelled cells (mm^2)

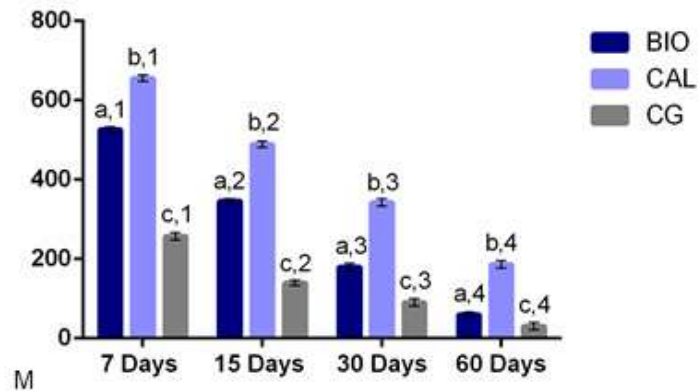
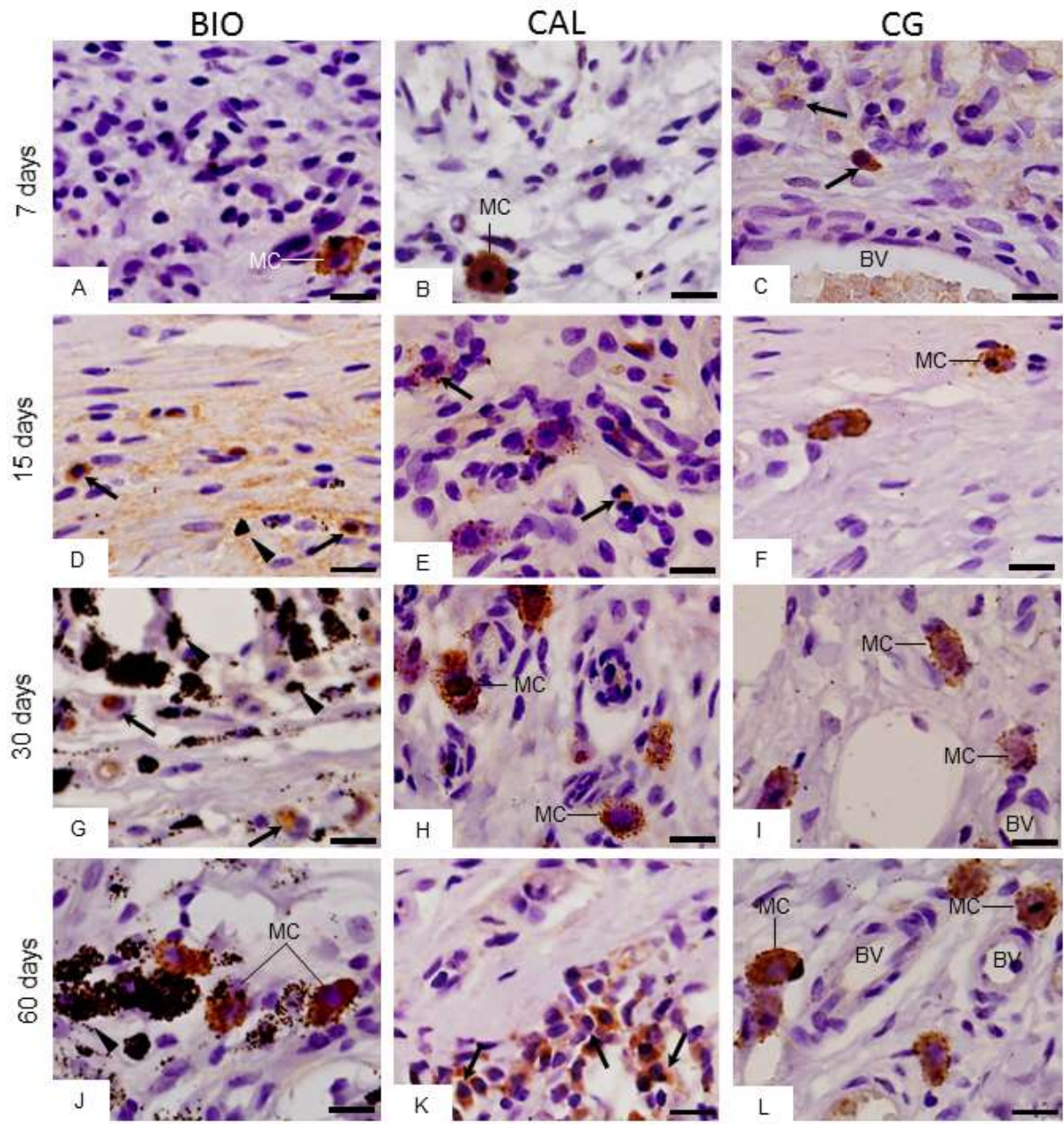
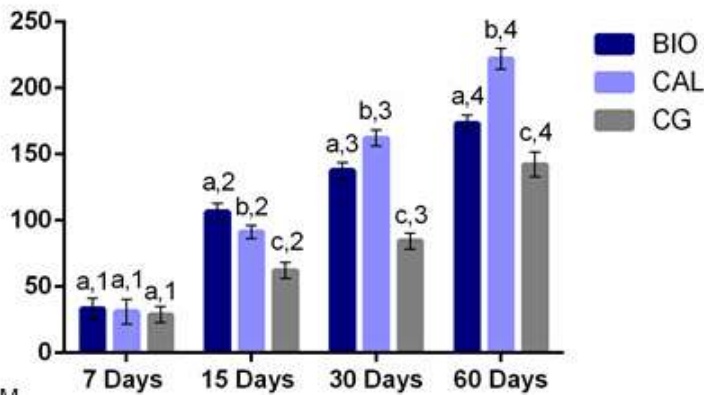


Figure 4 (A-L) - Light micrographs showing portions of capsule of sections submitted to immunohistochemistry reaction to detection of IL-6 (brown/yellow colour) and counterstained with haematoxylin. In all periods, inflammatory cells with strong immunolabelling in their cytoplasm (arrows) are present in the capsules of all groups. Immunolabelled fibroblasts (Fb) are also observed. BV, blood vessels; material particles (arrowheads). Bars: 18 μ m. **Figure 4M** – The graphic shows the values (expressed as mean $\pm$ standard deviation) of the numerical density of IL-6-immunolabelled cells in the capsules around Bio-C Temp (BIO), Calen (CAL) and Control (GC) specimens at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).



Number of IL-10-immunolabelled cells (mm²)



M

Figure 5 (A-L) - Light micrographs showing portions of capsule of sections submitted to immunohistochemistry reaction to detect IL-10 (brown/yellow colour) and counterstained with haematoxylin. Note that few immunostained cells are present in the capsules of all groups, particularly at 7 days (Figs. A-C). In all groups, an evident immunolabelling is present in the mast cells (MC). Inflammatory cells (arrows); BV, blood vessels; Arrowhead: material particles. Bars: 18 μ m. **Figure 5M** – The graphic shows the values (expressed as mean $\pm$ standard deviation) of the numerical density of IL-10-immunolabelled cells in the capsules around Bio-C Temp (BIO), Calen (CAL) and Control (GC) specimens at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Birefringent collagen content in capsules

At 7 days, all groups exhibited capsules with few and thin birefringent collagen fibres (Figs. 6A-C). On 60th day, an evident increase in the birefringence was observed in the capsules of all groups (Figs. 6D-F). The quantitative analysis (Fig. 6G) showed that the amount of birefringent collagen was similar among the groups ($p > 0.05$) at 7 and 15 days. Although no significant difference between BIO and CAL was found at 30 days, the amount of birefringent collagen was significantly greater in BIO than CAL specimens at 60 days ($p < 0.0001$). After 30 and 60 days, the collagen content was significantly greater in CG than in BIO and CAL groups ($p < 0.0001$). The analysis revealed a significant increase in the collagen amount in BIO group at 60 days ($p < 0.0001$). In contrast, no significant difference was detected in the CAL group over time ($p > 0.05$). In the CG, the amount of collagen was significantly greater at 30 and 60 days than in the periods of 7 and 15 days.

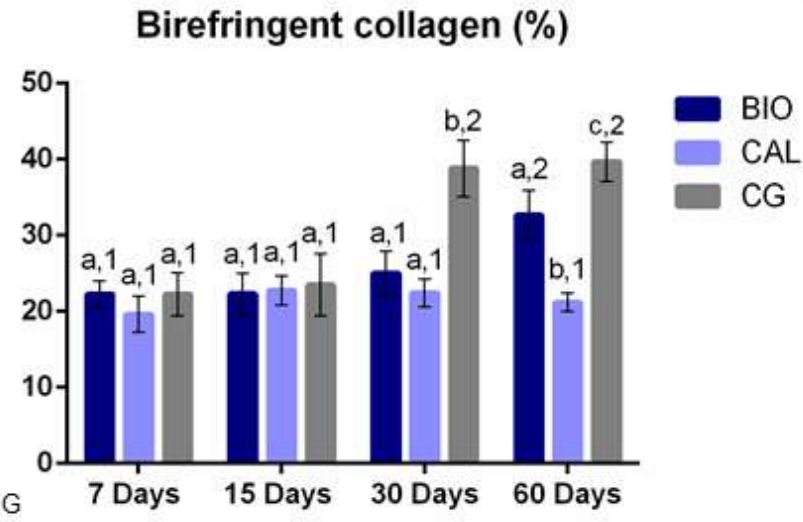
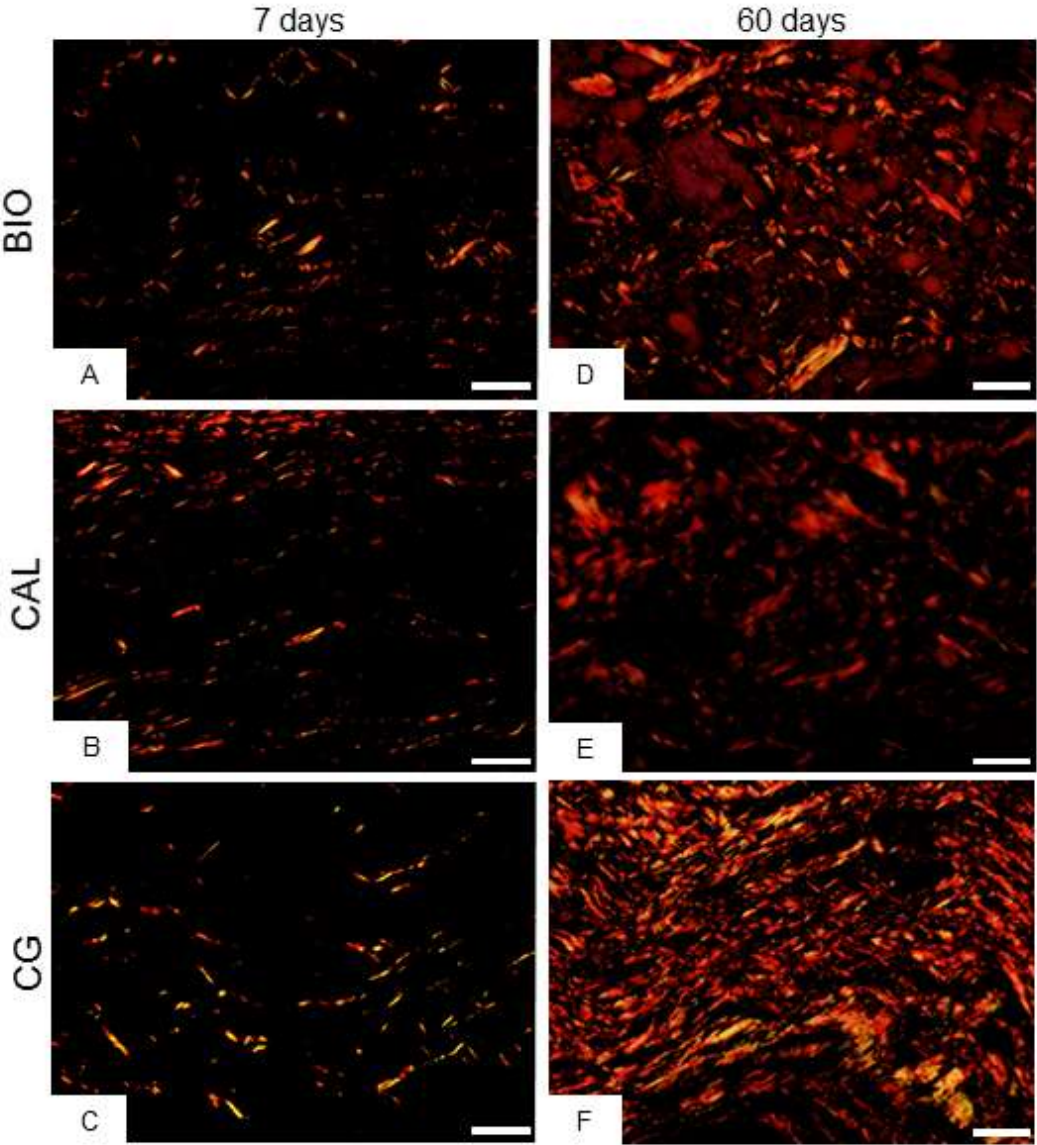


Figure 6 (A–F) – Light micrographs showing portions of capsule from sections subjected to picrosirius-red and analyzed under polarized illumination. At 7 days, thin birefringent collagen fibres (in red-orange) are dispersed in the capsules. At 60 days, the capsules exhibit thick bundles of birefringent collagen; note an accentuated birefringence in capsules of BIO (Fig. D) and CG (Fig. F) groups compared to the CAL group (Fig. E). Bars: 18 μm . **Figure 6M** – The graphic shows the values (expressed as mean $\pm$ standard deviation) of the amount of birefringent collagen (in percentage) in the capsules around Bio-C Temp (BIO), Calen (CAL) and Control (GC) specimens at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).

DISCUSSION

This is the first study that evaluated the serum GOT and GPT levels and biocompatibility *in vivo* of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament after implantation into the subcutaneous tissues of rats. Morphological and quantitative analyses of capsules around intracanal medications at different time points allows evaluating the injured tissue as well as the complex cascade of cytokines caused by these medicaments, which may lead to chronic inflammatory reaction or tissue repair¹⁶⁻¹⁸. Furthermore, this methodology allows us to investigate whether dental materials could promote systemic changes¹⁸. The null hypothesis was rejected since Bio-C Temp favouring the connective tissue repair quickly in comparison with the calcium hydroxide paste.

In the present study, both the bioceramic medication and calcium hydroxide-based paste did not promote changes in serum GOT and GPT levels in comparison with CG after 7 and 60 days of implantation. Therefore, the intracanal medications may not be hepatotoxic, since the measurement in serum of GOT and GPT levels can be used as biochemical parameters of liver function¹⁹. Usually, hepatic enzymatic changes are associated with structural liver damage²⁰. Low cellular viability has been demonstrated when extracts of Bio-C Temp is added to human dental pulp cells (hDPCs)¹⁴ and osteoblast-like cell line (Saos-2)¹². The low cytocompatibility of this bioceramic intracanal medication may be explained by presence of titanium dioxide¹⁴, which promotes cell damage culminating in cell death by apoptosis²¹. According to the manufacturer Bio-C Temp also contains base resin in its composition. It is known that resins can release substances, which may promote local and systemic adverse reactions²². Here, serum GOT and GPT levels suggest that Bio-C Temp and calcium hydroxide-based pastes may not promote liver injury. However, further studies are need to evaluate whether these intracanal medications promote structural changes in the liver.

The morphological and quantitative analyses revealed that, in all groups, the greatest values of inflammatory cells were observed at 7 days. The inflammatory reaction induced by empty polyethylene tubes suggest that surgical trauma may stimulate the recruitment of inflammatory cells and, may be responsible, at least the part, for highest numerical density of inflammatory cells initially found, as reported in other studies^{16,17,23-25}. However, the number of ICs in the BIO and CAL specimens was around two folds greater than in CG, which may be attributed to the alkaline pH and

chemical composition of these intracanal medications. The Calen paste provides an alkaline pH around 12.4 to microenvironment²⁶ and, Bio-C Temp provides pH around 10.79 after 7 days¹³.

The alkaline pH induces the recruitment of ICs to the microenvironment^{16,27,28} and formation of a coagulation necrosis zone²⁷ in the tissue surface in contact with the material^{15,29,30}. At all periods, necrotic areas remained until 60 days and the greatest number of ICs were observed in the capsules around calcium hydroxide-based paste specimens, indicating, therefore, that the release of hydroxyl ions may be maintained for a long time in the calcium hydroxide-based pastes associated with a viscous vehicle. Furthermore, this group exhibited greater IL-6-immunostaining and lower amount of collagen than Bio-C Temp. IL-6 is a multifunctional pro-inflammatory cytokine, being an indicative parameter of the inflammatory reaction intensity^{31,32}. Studies have shown a direct correlation between the reduction in the number of ICs and IL-6 immunoexpression in the capsules adjacent to the calcium silicate-based materials implanted in rat subcutaneous^{17,31,33,34}. In the present study, the reduction in the immunoexpression of IL-6 was also accompanied by decrease in the number of ICs reinforcing the concept that this interleukin may modulate the inflammatory reaction in response to the endodontic materials. The irritating potential of Calen can also be justified by the harmful activity of zinc ions from the radiopacifying agent zinc oxide present in this paste³⁵. However, this irritant potential decreases over time corroborating with other studies^{15,29,30}.

The thickness of capsules around BIO and CAL specimens increased significantly until on 30th day. The thickening of connective tissue around intracanal medications was accompanied by increase of material particles dispersed throughout the capsules. The massive presence of material particles may be due to the flow and solubility of these pastes, particularly, of Bio-C Temp. However, these properties are needed to the filling of the root canals and penetration into the dentinal tubules and periapical region³, acting in areas which are not achieved by the channel instrumentation². The Calen has as vehicle the polyethylene glycol 400, which improves the dissolution of calcium hydroxide and release of hydroxyl ions²⁶. Bio-C Temp contains in its composition the base resin as a vehicle, which allows better insertion of the material in the root canals³⁶. From 30 to 60 days, the thickness of capsules around intracanal medications reduced significantly suggesting a remodelling process of the connective tissue of these capsules.

There is evidence showing a strong positive correlation between IL-6 and matrix metalloproteinases (MMP), such as MMP-1 and MMP-9, enzymes responsible for extracellular matrix degradation³⁷. Here, it is possible to suggest that the IL-6 may exert a control on the degradation of extracellular matrix components since the highest values of this interleukin were parallel to lowest collagen content in the CAL specimens while the lowest immunoexpression of IL-6 was concomitant with accentuated amount of collagen in CG specimens. These findings point to a participation of IL-6 in the breakdown of extracellular matrix components in the capsules around implants in the subcutaneous tissue.

Moreover, the reduction in the immunoexpression of IL-6 was also accompanied by gradual increase of IL-10-immunostaining over time. In the present study, several mast cells exhibited an accentuated immunolabelling for IL-10. Although IL-10-immunopositive mast cells were observed in all periods, the marked presence of immunostained mast cells at 60 days may be associated with the high formation of collagen, suggesting tissue repair. One of the anti-inflammatory actions of IL-10 is the ability to modulate the production of inflammatory cytokines by mast cells. Mast cells contain IL-10 receptor, and, via IL-10, release several inflammatory mediators, which mediate the immune and inflammatory responses [Blank] and participate in the tissue repair and remodeling^{32,38}. The accentuated number of mast cells in the capsules around a reparative calcium silicate-based biomaterial, Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossès, France), was associated with the proliferation of fibroblasts and, consequently, with the collagen formation supporting the concept that this cell is involved in the connective tissue repair³². Moreover, there is evidence that IL-10 inhibits IL-6 production by mast cells in response to inflammation and bacterial infection³⁹. Thus, our findings taken together indicate that the increase in the IL-10 may inhibit the immunoexpression of IL-6 in the capsules mitigating the inflammatory reaction promoted by bioceramic and calcium hydroxide intracanal medications implanted in the subcutaneous tissues.

No study evaluating the biological *in vivo* behavior of the Bio-C Temp was found in the literature. Our findings indicate that, in the initial period, bioceramic medication induced an intense inflammatory reaction, which gradually reduced over time. Thus, at 60 days, the capsules around Bio-C Temp specimens showed bundles of collagen fibres surrounding the material particles, pointing to a

reorganization of the connective tissue. The biocompatibility of tricalcium silicate-based materials^{16,23,25} seems to be due to the stable chemical comportment of the calcium silicate in biological environment⁴⁰. Therefore, it is expected that Bio-C Temp, when in contact with periapical tissues, may induce the tissue repair. However, further studies are necessary to confirm the safety and viability of this new intracanal medication in clinical practice.

In conclusion Serum GOT and GPT levels suggest that bioceramic and calcium hydroxide-based intracanal medications had no hepatotoxicity effect. Bio-C Temp caused initial tissue damage that was quickly suppressed in comparison to those caused by calcium hydroxide-based paste, favouring the repair of connective tissue indicating, therefore, that the new bioceramic material is biocompatible.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures

The present research protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research. Sixty adult male Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighing 220-250 g were used. The rats were maintained in polyethylene cages under 12h light/12h dark cycle at controlled temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity ($55\pm 10\%$), with water and food provided *ad libitum*. The study was carried out in accordance with the US National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications n° 80-23, 1996).

Sixty rats were randomly distributed into three groups containing 20 animals each: BIO (BIO-C TEMP Group, Angelus, Londrina, Brazil); CAL (Calen Group, SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brazil) and CG (control group, empty polyethylene tubes). Each cage was identified according to the group and period. The sample size for this study was calculated based in previous studies [16-19]. The size sample was calculated considering an alpha error of 0.05 to recognize a significant difference and 90% test power for detection of 50% difference among experimental groups and CG. Thus, a sample of 5 rats per group in each time point was required, totalling twenty animals per group.

The animals were anaesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/kg of body weight) and xylazine hydrochloride (8 mg/kg of body weight) by intraperitoneal route. After shaved and

disinfection with 5% iodine solution, a 2.0 cm-long incision was made in a head-to-tail orientation using a n° 15 scalpel (Fibra Cirúrgica, Joinville, SC, Brazil). The polyethylene tube (Embramed Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, São Paulo, Brazil) with 10.0 mm length and 1.6 mm diameter, previously sterilized with ethylene oxide, were implanted into the subcutaneous tissue. In each animal, two polyethylene tubes of the same group were implanted for 7, 15, 30 and 60 days.

Serum hepatic enzymes level

To evaluate whether intracanal medicaments cause changes in the hepatic enzymes (GOT and GPT), the blood samples were collected through cardiac puncture with BD Vacutainer® Blood Collection Tubes (SSTII Plus, BD Biosciences) at 7 and 60 days. After clot formation, the blood was centrifuged (Excelsa® II 206 BL; Fanem Ltda., Guarulhos, SP, Brazil) at 3500 rpm for 10 minutes and the serum was stored at -20° C. The GOT and GPT serum concentrations were determined using the AST (aspartate aminotransferase) and ALT (Alanine Aminotransferase), respectively, by chemiluminescence immunoassay kits (Beckman Coulter, CAR, USA). Concentrations were measured using a multiparametric automatic analyzer (Cobas ÍNTEGRA® 400 Plus; Roche Diagnóstica Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil). The analyses were performed at São Lucas Clinical and Microbiological Laboratory. The experiments were carried out in duplicate and the averages were calculated.

Procedures for paraffin embedding

The tissue reaction promoted by intracanal medications was carried out in all groups at 7, 15, 30, and 60 days. The animals were euthanized with overdose of ketamine and xylazine and, subsequently, the specimens containing the implants surrounded by tissues were removed and immersed in 4% formaldehyde (freshly prepared from paraformaldehyde) buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium phosphate. After 48 hours, the specimens were dehydrated with ethanol graded concentrations, treated with xylene, and embedded in paraffin. In each specimen, forty serial longitudinal sections (6 µm thick) were obtained and adhered to glass slides. Three non-serial sections were stained with Carazzi's haematoxylin and eosin (HE) for morphological analysis of the capsules, and to estimate the capsule thickness and the numerical density of inflammatory cells. Three non-serial sections were subjected to the picrosirius-red to estimate the collagen content. Other non-serial

sections were adhered to slides previously treated with silane 4% (Sigma-Aldrich) and submitted to the immunohistochemistry reactions for detection of interleukin-6 (IL-6) and IL-10.

The histological description and quantitative data were obtained using a digital camera (DP-71, Olympus, Tokyo, Japan) attached to a light microscope (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) and an image analysis system (Image-Pro Express 6.0, Olympus). The analyses were conducted by one calibrated and blinded examiner.

Numerical density of inflammatory cells

The ICs was obtained from three non-serial sections of each implant. In each section, an image of the central portion of capsule in close juxtaposition to the opening of implanted tube was captured at x695 magnification. In this standardized field (0.09 mm^2), the number of inflammatory cells (neutrophils, lymphocytes, plasma cells, and macrophages) was computed using the image analysis system. Thus, the number of inflammatory cells per millimetre square of capsule was obtained dividing the total number of inflammatory cells by the total standardized field of capsule^{16,17,23,31,34}.

Capsule thickness

For each specimen, three HE-stained non-serial sections were used, totalling 15 sections per group in each period. To estimate the capsule thickness, an image at x65 magnification was captured; the measurement was made from the capsule surface to the adjacent tissues (in micrometers). In each specimen, the mean value of capsule thickness was calculated from the three sections analyzed^{31,33,34}.

Immunohistochemical detection of IL-6 and IL-10

For the detection of interleukin-6 and interleukin-10, mouse monoclonal anti-IL-6 antibody (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; code: ab 9324) and mouse monoclonal anti-IL-10 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; code SC-8438) were used. After deparaffinization and hydration, the slides were immersed in 0.001M sodium citrate buffer (pH 6.0) and subjected to microwave two cycles for 20 minutes at 96-98°C. After cooling-off, the slides were washed in 0.01 M sodium phosphate buffer (PBS) for 15 minutes. For inactivation of endogenous peroxidase, the sections were immersed for 30 minutes in 5% aqueous hydrogen peroxide. After washing in PBS, the

sections were incubated for 20 minutes with 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) at room temperature. Afterwards, the sections were incubated with anti-IL-6 antibody (diluted at 1:400) or anti-IL-10 antibody (diluted at 1:100) in a humid chamber at 4° C for 16 hours. After washings with PBS, the sections were incubated with the Labeled StreptAvidin-Biotin kit (Universal Dako LSAB, Dako Inc., Carpinteria, CA, USA; K0675) for 60 minutes at room temperature. Peroxidase activity was revealed by 3,3'-diaminobenzidine chromogen (DAB substrate, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 3 min. The sections were stained with Carazzi's haematoxylin. As a negative control, the sections were incubated with non-immune serum. Subsequently, the quantification of immunostained cells was performed.

The number of IL6- and IL10-immunolabelled cells was estimated in the capsules of five specimens of each group/period. In each section, a standardized area (0.09 mm²) was captured at x695 magnification. Using the image analysis system, the number of immunolabelled cells (brown-yellow colour) was computed^{17,23,31,34}.

Measurement of birefringent collagen

The amount of collagen was estimated in three non-serial sections stained with picrosirius-red and analyzed under polarized illumination. In each section, the birefringent collagen was measured in a standardized field (0.09 mm²) of the capsule at x695 magnification. All images were captured with standardized light intensity, field diaphragm aperture, condenser diaphragm and exposure time. The amount of birefringent collagen was performed using the ImageJ image processor, which provided the number of pixels of each colour frequency (red, orange, yellow and green) occupied in the total pixel value of the captured images^{25,33}.

Statistical analysis

The GraphPad Prism 6.01 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, United States) was used, and the data were submitted to two-way ANOVA analysis of variance, followed by the Tukey test ($p \leq 0.05$). All data were presented as mean $\pm$ standard deviation.

References

1. Siqueira, J. F. Jr. & Rôças, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J. Endod.* **34**, 1291-1301, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.028> (2008).
2. Vera, J. *et al.* One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J. Endod.* **38**, 1040-1052, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.04.010> (2012).
3. Chong, B. S. & Pitt Ford, T. R. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int. Endod. J.* **25**, 97-106, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.1992.tb00743.x> (1992).
4. Hasselgren, G., Olsson, B. & Cvek, M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J. Endod.* **14**, 125-127, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0099-2399\(88\)80212-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0099-2399(88)80212-7) (1998).
5. Mizuno, M. & Banzai, Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int. Endod. J.* **41**, 933-938. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01420.x> (2008).
6. Silva, L. A. *et al.* Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. *Braz. Dent. J.* **21**, 38-45, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-64402010000100006> (2010).
7. Espaladori, M. C. *et al.* Selenium intracanal dressing: effects on the periapical immune response. *Clin. Oral. Investig.* **25**, 2951-2958, DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-020-03615-8> (2021).
8. Prati, C. & Gandolfi, M. G. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent. Mater.* **31**, 351-370, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.01.004> (2015).
9. Camilleri, J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent. Mater.* **27**, 836-844, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2011.04.010> (2011).
10. Giacomino, C. M., Wealleans, J. A. , Kuhn, N. & Diogenes, A. Comparative Biocompatibility and osteogenic potential of two bioceramic sealers. *J. Endod.* **45**, 51-56, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2018.08.007> (2019).

11. Camps, J., Jeanneau, C., El Ayachi, I., Laurent, P. & About, I. Bioactivity of a calcium silicate-based endodontic cement (BioRoot RCS): Interactions with human periodontal ligament cells *in vitro*. *J. Endod.* **41**, 1469-1473, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.011> (2015).
12. Guerreiro, J. C. M. *et al.* Antibacterial activity, cytocompatibility and effect of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament on osteoblast biology. *Int. Endod. J.* **54**, 1155-1165, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13502> (2021).
13. Villa, N. *et al.* A new calcium silicate-based root canal dressing: physical and chemical properties, cytotoxicity and dentinal tubule penetration. *Braz. Dent. J.* **31**, 598-604, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440202003376> (2020).
14. Oliveira, L. V. *et al.* A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. *Int. Endod. J.* **53**, 1140-1152, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13308> (2020).
15. da Silva, G. F. *et al.* Effect of association of non-steroidal anti-inflammatory and antibiotic agents with calcium hydroxide pastes on their cytotoxicity and biocompatibility. *Clin. Oral. Investig.* **24**, 757-763, DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-019-02923-y> (2020).
16. Viola, N. V. *et al.* Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **100**, 1773-1781, DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.32744> (2012).
17. da Fonseca, T. S. *et al.* *In vivo* evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int. Endod. J.* **49**, 145-153, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12435> (2016).
18. Delfino, M. M. *et al.* Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with White MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *Int. Endod. J.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13567> (2021).
19. Mahmud, Z., Bachar, S. & Qais, N. Antioxidant and hepatoprotective activities of ethanolic extracts of leaves of *premna esculenta roxb.* Against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *J. Young. Pharm.* **4**, 228-234, DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0975-1483> (2012).

20. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W. & Schomaker, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. **245**, 194-205, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021> (2008).
21. Dhupal, M. *et al.* Immunotoxicity of titanium dioxide nanoparticles via simultaneous induction of apoptosis and multiple toll-like receptors signaling through ROS-dependent SAPK/JNK and p38 MAPK activation. *Int. J. Nanomedicine*. **13**, 6735-6750, DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S176087> (2018).
22. Bakopoulou, A., Papadopoulos, T. & Garefis, P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 3861-3899, DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms10093861> (2009).
23. Silva, G. F. *et al.* Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **102**, 4336-4345, DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.35099> (2014).
24. Silva, G. F., Tanomaru-Filho, M., Bernardi, M. I., Guerreiro-Tanomaru, J. M. & Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin. Oral. Investig.* **19**, 2015-2025, DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-015-1412-9> (2015).
25. Silva, G. F. *et al.* Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. *Int. Endod. J.* **50**, e95-e108, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12789> (2017).
26. Leonardo, M. R., Bezerra da Silva, L. A., Utrilla, L. S., Leonardo, R. T. & Consolaro, A. Effect of intracanal dressings on repair and apical bridging of teeth with incomplete root formation. *Endod. Dent. Traumatol.* **9**, 25-30, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-9657.1993.tb00456.x> (1993).
27. Holland, R., Pinheiro, C. E., de Mello, W., Nery, M. J. & de Souza, V. Histochemical analysis of the dogs' dental pulp after pulp capping with calcium, barium, and strontium hydroxides. *J. Endod.* **8**, 444-447, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0099-2399\(82\)80148-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0099-2399(82)80148-9) (1982).
28. Hoshino, R. A. *et al.* Physical properties, antimicrobial activity and *in vivo* tissue response to Apexit Plus. *Materials. (Basel)*. **13**, 1171, DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ma13051171> (2020).
29. Andolfatto, C. *et al.* Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *ISRN*.

Dent. **2012**, 904963, DOI: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/904963> (2012).

30. Midená, R. Z. *et al.* Analysis of the reaction of subcutaneous tissues in rats and the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste used in association with different substances. *J. Appl. Oral. Sci.* **23**, 508-514, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-775720140049> (2015).

31. Delfino, M. M., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Tanomaru-Filho, M., Sasso-Cerri, E. & Cerri, P. S. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci. Rep.* **10**, 7173, DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-64041-0> (2020).

32. da Fonseca, T. S. *et al.* Mast cells and immunoexpression of FGF-1 and Ki-67 in rat subcutaneous tissue following the implantation of Biodentine and MTA Angelus. *Int. Endod. J.* **52**, 54-67, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12981> (2019).

33. Saraiva, J. A. *et al.* Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed. Mater.* **13**, 035002, DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/1748-605X/aaa1f5> (2018).

34. Silva, E. C. A. *et al.* Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an *in vivo* study in rats. *Int. Endod. J.* **54**, 100-111, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13398> (2021).

35. Economides, N. *et al.* Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J. Endod.* **21**, 122-127, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)80436-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0099-2399(06)80436-x) (1995).

36. Cosme-Silva, L. *et al.* Biocompatibility and biomineralization ability of Bio-C Pulpecto. A histological and immunohistochemical study. *Int. J. Paediatr. Dent.* **29**, 352-360, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ipd.12464> (2019).

37. de Oliveira, P. A., de Pizzol-Júnior, J. P., Longhini, R., Sasso-Cerri, E. & Cerri, P. S. Cimetidine reduces interleukin-6, matrix metalloproteinases-1 and -9 immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontal disease. *J. Periodontol.* **88**, 100-111, DOI: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2016.160132> (2017).

38. Blank, U. *et al.* Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front. Immunol.* **5**, 453, DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00453> (2014).
39. Marshall, J. S., Leal-Berumen, I., Nielsen, L., Glibetic, M. & Jordana, M. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *J. Clin. Invest.* **97**, 1122-1128, DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118506> (1996).
40. Candeiro, G. T., Correia, F. C., Duarte, M. A., Ribeiro-Siqueira, D. C. & Gavini, G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J. Endod.* **38**, 842-845, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.02.029> (2012).

Acknowledgments

This work was carried out with the financial support from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP: 2018/16848-2), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and CAPES (code 001).

Author contributions

C.S.L. contributed to the conceptualization, experiment, methodology, analysis, writing, editing, and critical review of the article.

M.M.D. contributed to the experiment, methodology, analysis, writing, and critical review of the article.

M.T.-F. contributed to the conceptualization, and critical review of the article.

E.S.-C. contributed to the experiment, methodology, analysis, writing, and critical review of the article.

J.M.G.-T. contributed to the experiment, analysis, writing, and critical review of the article.

P.S.C. contributed to the conceptualization, funding acquisition, methodology, supervision, project administration, writing, and critical review of the article.

All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

3.2 Publicação 2*

Bioactive potential of Bio-C Temp demonstrated by systemic markers of mineralization and immunoexpression of bone proteins after implantation in rat subcutaneous tissues

ABSTRACT

To evaluate *in vivo* the bioactive potential of bioceramic intracanal medication Bio-C Temp (BIO) in comparison to a calcium hydroxide-based intracanal medication (Calen; CAL). Polyethylene tubes filled with medications, and empty tubes (control group, CG,) were implanted into the subcutaneous tissue of rats. After 7, 15, 30 and 60 days, the blood was collected for calcium (Ca^{+2}), phosphorous (P^-) and alkaline phosphatase (ALP) measurement, and the implants with surrounding tissues were removed. The number of fibroblasts (FB), immunohistochemistry for detection of osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN), von Kossa method and analysis of unstained sections under polarized light were performed. The data were submitted to two-way ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$). No significant difference was observed in the serum Ca^{+2} level between BIO and CG samples, in all periods. At 7 days, the serum P^- levels were greater in BIO and CAL samples than in CG ($p < 0.0001$), but no difference was seen among the groups at 15, 30 and 60 days. After 7, 15 and 30 days, greater ALP levels were observed in BIO and CAL specimens than in CG ($p < 0.0001$) whereas no significant difference was observed among the groups at 60 days. From 7 to 60 days, an increase in the number of FB, OCN- and OPN-immunolabelled cells was observed in BIO and CAL groups ($p < 0.0001$). At 60 days, no significant difference in the number of FB was seen between BIO and CAL. BIO and CAL specimens showed von Kossa-positive and birefringent structures while, in the CG specimens, these structures and OCN- and OPN-immunolabelled cells were not seen. Bio-C Temp caused an increase in the levels of ALP, an essential enzyme for biomineralization process, and induced the production of osteocalcin and osteopontin by connective tissue cells as well as the deposition of calcite, suggesting bioactive potential.

Keywords: bioactive material; calcium silicate; immunohistochemistry; osteocalcin; osteopontin.

* Artigo escrito segundo normas do periódico *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*.

INTRODUCTION

Calcium hydroxide is recommended during endodontic treatment due to its antimicrobial action and biological properties, such as its ability to induce deposition of mineralized tissue.¹ It has been demonstrated that calcium hydroxide induces mineralization due to its ionic dissociation giving rise to calcium and hydroxyl ions in an aqueous medium³ providing an alkaline environment that favors repair tissue.⁴ Alkaline environment favors the calcification,³ since neutralizes lactic acid from osteoclasts and activates alkaline phosphatase (ALP), an enzyme that has an important role in the formation of hard tissue.¹ Calcium ions also play an essential role in mineralization, stimulating the expression of the fibronectin gene⁴.

Previously to the use of a repairing material or filling periodic changes of calcium hydroxide-based intracanal medicament are used⁵ to induce the formation and repair of mineralized tissue.⁶ Among the indications, these intracanal medications are used for treatment of dental trauma,^{5,7} root perforations⁶, root resorption, in pulpotomy and to induce apexification.² However, it has been suggested that long-term exposure to calcium hydroxide-based medications induces collagen degradation⁵ and, hence, weakening the root dentine.⁸ Moreover, the calcium hydroxide-based pastes have low radiopacity and flow capacity, which difficult their insertion into the root canal.⁹

Bioceramic endodontic materials have stood out for being bioactive,¹⁰ due to the interaction of the material with dentine, forming a mineralized intermediate zone in the presence of moisture.¹¹ Furthermore, the bioceramic materials modulate the response of host cells favoring the bone repair, since favors the osteoblasts survival and differentiation, cells actively involved in the periapical repair¹² enabling the formation of mineralized tissue.¹³ Bioceramic endodontic materials are biocompatible,^{14,15} non-cytotoxic¹⁶ and have satisfactory physico-chemical properties.¹⁶⁻¹⁸ There is currently a growing interest in the development of new materials based on bioactive calcium silicate.¹⁹

Bio-C Temp (Angelus Dental Products Industry, Londrina, PR, Brazil) is a ready-to-use bioceramic paste, which contains calcium silicates associated with calcium tungstate and titanium oxide radiopacifiers, calcium aluminate, calcium oxide and base resin as a vehicle that does not allow hydration and setting of the material. According to the manufacturer, this material can be used in teeth with treatment of incomplete root formation, perforations, external and internal root resorption, previously to the use of repair and filling materials. Bio-C Temp eliminates the need for new applications, constituting an advantage over calcium hydroxide-based medications that require frequent changes.²⁰ Moreover, Bio-C Temp has

been suggested in pulpotomy cases for the induction of a calcified barrier²¹ and treatment of and endodontic regeneration.^{22,23}

In vitro studies have demonstrated alkaline phosphatase activity and deposition of mineralized nodules in cultures of Saos-2 cells containing diluted extracts of Bio-C Temp, suggesting that this medication is cytocompatible.^{19,21-23} Bio-C Temp is biocompatible when implanted into subcutaneous tissues as well as does not cause changes in liver enzymes.²⁴ In addition, this bioceramic medication provides an alkaline pH to the microenvironment, releases calcium ions when immersed in solution^{19,21} and exhibits radiopacity about 7 mm/Al.¹⁹

No *in vivo* study evaluating the bioactive potential of calcium silicate medication Bio-C Temp was found in the literature. Materials that promote increase in osteogenic response are of great value for endodontic therapy.¹² Extracellular matrix proteins of mineralized tissues, such as osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN) can be evaluated by immunohistochemistry reactions.^{14,25-27} In addition, inorganic constituents of mineralized tissues including calcium (Ca^{+2}) and phosphorus (P^-), and ALP, an enzyme involved in the mineralization, can be measured in the serum in order to investigate whether the endodontic materials cause changes in these parameters associated with the^{26,28}.

Therefore, in the present study, we evaluated the bioactive potential *in vivo* of an intracanal medication of calcium silicate, Bio-C Temp, in comparison with calcium hydroxide-based intracanal medication (Calen, SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brazil). For this purpose, the concentrations of Ca^{+2} , P^- and ALP in the serum were measured at 7, 15, 30 and 60 days after implantation of Bio-C Temp in the subcutaneous tissues of rats. Moreover, immunoexpression of OCN and OPN, typical proteins of mineralized tissues, and deposition of calcite in the capsules around the implants were also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Experimental procedures

This research was approved by the Ethical Committee for Animal Research of XXXX XXX (# 22/2018). Sixty Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) adult male rats, weighing 250-280 g were randomly distributed into three groups (n=20 per group): BIO (BIO-C TEMP Group, Angelus, Londrina, Brazil), CAL (Calen Group, SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brazil) and CG (control group, empty polyethylene tubes). Calen intracanal medication, a calcium hydroxide-based paste.

The polyethylene tubes (Embramed Indústria Comércio, São Paulo, SP, Brazil) with 10.0 mm length and 1.6 mm diameter, previously sterilized with ethylene oxide, were filled with the materials or kept empty (CG) and implanted into the subcutaneous connective tissue. Previously, the animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (80 mg/kg of body weight) combined with xylazine hydrochloride (8 mg/kg of body weight). After trichotomy and disinfection with 5% iodine solution, a 2.0 cm-long incision was made in a head-to-tail orientation using a n° 15 scalpel (Fibra Cirúrgica, Joinville, SC, Brazil), and the polyethylene tube was placed into the subcutaneous pocket.

After 7, 15, 30 and 60 days of implantation, the animals were anaesthetized, as previously described, and cardiac puncture of the left ventricle was performed with a vacuum tube (Vacuette®, Greiner Bio-One Brasil Produtos Médicos Hospitalares Ltda., Americana, SP, Brazil) with a needle (Med Goldman Indústria e Comércio Ltda., Manaus, AM, Brazil) and connected to a BD Vacutainer® adapter (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., Curitiba, PR, Brazil). After blood collection, the animals were killed with anesthetic overdose and the implants and surrounding tissues were removed. The specimens were fixed for 48 hours in 4% formaldehyde buffered with 0.1 M sodium phosphate at pH 7.2, and the specimens were processed for paraffin embedding. Non-serial sections (6 µm thick) were adhered to slides previously treated with 4% silane (Sigma-Aldrich). The sections were subjected to immunohistochemistry reactions for detection of OCN and OPN. Other non-serial sections were submitted to the von Kossa histochemical reaction to evaluate the calcium deposits in the capsules and Masson's trichrome staining was used for the quantification of fibroblasts.²⁹

Concentration of Ca^{+2} , P^- and ALP in the serum

After blood collection (as described above) and clot formation, the blood was centrifuged (Excelsa® II 206 BL; Fanem Ltda., Guarulhos, SP, Brazil) at 3500 rpm for 10 minutes and the serum was stored at -20 ° C. The calcium, phosphorus and ALP concentrations were determined using the Calcium Arsenazo III assay kit (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, USA), Inorganic Phosphorus (Beckman Coulter) and Alkaline Phosphatase (Beckman Coulter), respectively. The sample absorbance was read on a spectrophotometer (Hitachi, model U 1100, Tokyo, Japan). The absorbance of calcium was determined at 660/700nm, phosphorus at 340nm and ALP at 410/480 nm. The experiments were carried out in triplicate and the averages were calculated.

Numerical density of fibroblasts

The number of fibroblasts was estimated from three non-serial sections stained with Masson's trichrome. The images of the capsules adjacent to the implants were captured with a camera (DP-71, Olympus - Japan) attached to a light microscope (Olympus, model BX-51), using the x40 objective (x695 final magnification). The fibroblasts, identified as fusiform or elliptical shape cells were estimated in a standardized field (0.09 mm^2) using an image analysis system (Image-Pro Express Olympus). In each specimen, the fibroblasts were counted in a total standardized area of 0.27 mm^2 , and the number of fibroblasts per mm^2 was estimated.^{29,}

Immunohistochemical detection of OCN and OPN

Deparaffinized sections were immersed in 0.001 M sodium citrate buffer at pH 6.0 and heated in a microwave oven at 96-98°C for 20 minutes. After cooling, the slides were washed in 0.01 M sodium phosphate buffer (PBS) for 15 minutes and immersed for 30 min in 5% hydrogen peroxide to inactivate the endogenous peroxidase. The sections were incubated for 20 minutes with 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) at room temperature. Sections were then incubated for 16 hours with mouse anti-osteocalcin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA; code SAB1306277; diluted at 1:300) or mouse anti-osteopontin monoclonal antibody (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; code: ab 166709; diluted at 1:100) in a humid chamber at 4°C. After washings, the sections were incubated for 1 hour with labelled polymer-HRP (EnVision + Dual Link System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, CA, USA; K4061) at room temperature. The peroxidase activity was revealed by 3,3'-diaminobenzidine chromogen (ImmPACT™ DAB substrate, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 3 min. The slides were washed with distilled water and, subsequently, the sections were counterstained with haematoxylin. In negative controls, the sections were incubated with non-immune serum.

The number of OCN- and OPN-immunolabelled cells was quantified in the capsules of all the animals. Using a light microscope (Olympus, BX-51) and an image analysis system (Image-Pro Express Olympus), the number of immunolabelled cells was estimated in a standardized area (0.09 mm^2) of the capsule in close juxtaposition to the opening of implanted tube.¹⁴

von Kossa histochemical reaction and analysis under polarized light

The deparaffinized sections were incubated in an aqueous solution containing 5% silver nitrate, under the action of an incandescent light (100 watts) for 1 hour. After

incubation, the sections were washed quickly in distilled water and, subsequently, the sections were immersed in 5% sodium hyposulfite for 5 minutes. Then, the sections were washed in running water and for 5 minutes in distilled water. After washing, the sections were submitted to the picosirius-red method, washed, dehydrated and mounted in resinous medium (Permount®, Fisher Scientific, New Jersey, USA) for analysis under a light microscope.

Dewaxed sections of all specimens were mounted in resinous medium (Permount®, Fisher Scientific, New Jersey, USA). These unstained sections were analyzed under polarized light to assess the presence of birefringent structures in the capsules.^{15,30,31}

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6.01 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, United States). The data were submitted to two-way ANOVA analysis of variance, followed by the Tukey test ($p < 0.05$). All data were presented as mean $\pm$ standard deviation.

RESULTS

Concentration of calcium, phosphorus and ALP in the serum

In all periods, the serum Ca^{+2} concentration in BIO group was similar to that of CG ($p > 0.05$). In contrast, the serum Ca^{+2} levels were greater in CAL group than in BIO and CG groups at 7 and 15 days. At 30 and 60 days, no significant difference among BIO, CAL and CG specimens was observed in the Ca^{+2} concentration ($p < 0.0001$). From 7 to 60 days, the Ca^{+2} level reduced significantly in all groups ($p < 0.0001$) (Figure 1 A).

As shown in Figure 1B, the serum P^- levels in BIO and CAL groups were greater than in CG specimens at 7 days. Moreover, significant difference was not found between BIO and CAL groups ($p = 0.0537$). At 15, 30 and 60 days, no significant difference was seen among groups ($p > 0.05$). From 7 to 60 days, significant reduction in the P^- level was observed in all groups ($p < 0.0001$).

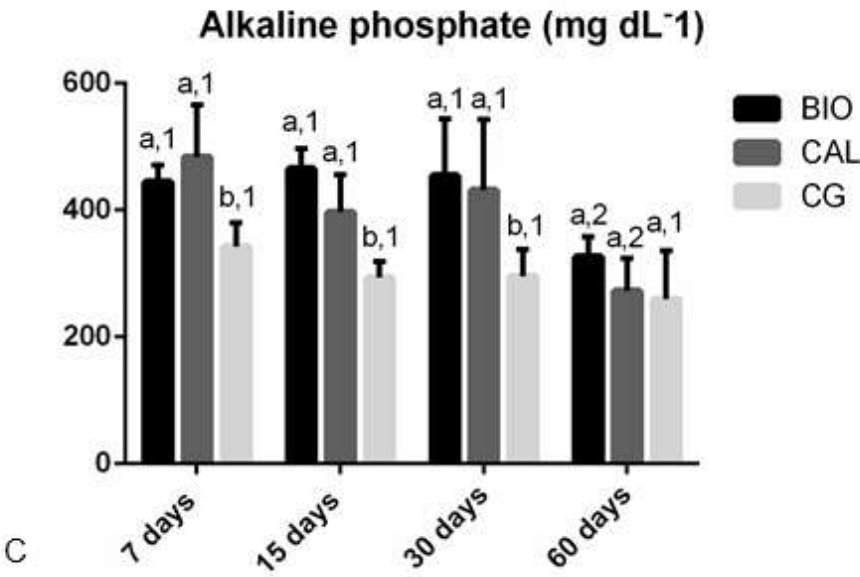
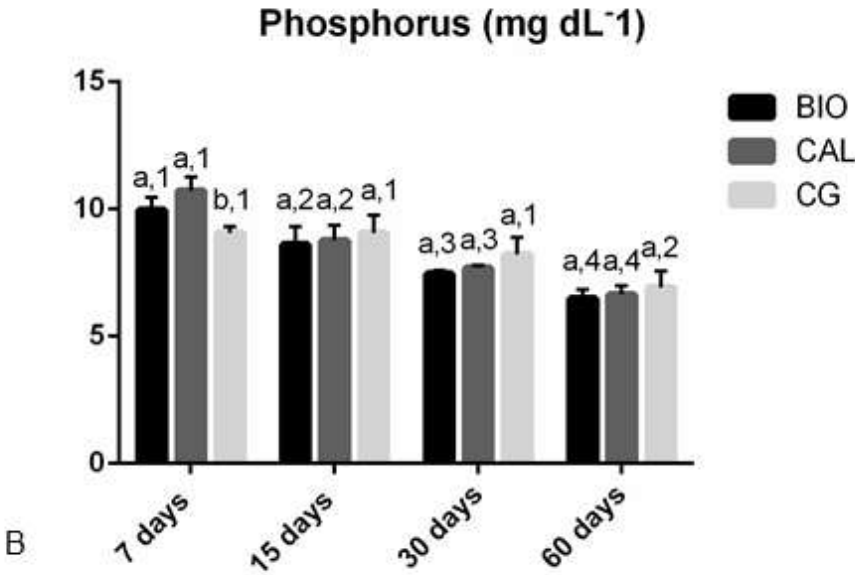
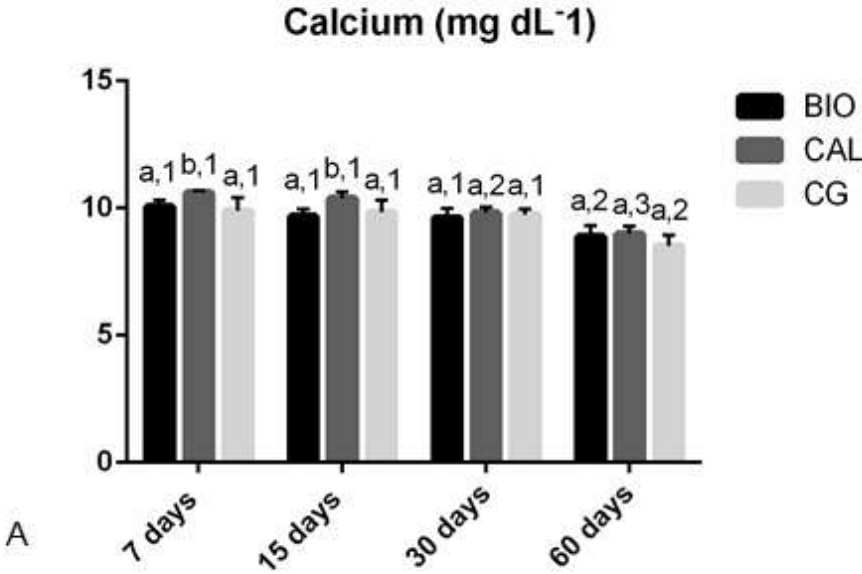
According to the Figure 1C, the serum ALP levels in the BIO and CAL groups were significantly higher than in the CG specimens at 7, 15 and 30 days ($p < 0.0001$). Moreover, there was no significant difference in the ALP concentration between BIO and CAL medications ($p > 0.05$). At 60 days, no significant difference was found among the BIO, CAL and CG groups ($p > 0.05$). From 30 to 60 days, the serum ALP levels decreased significantly in

the BIO and CAL groups ($p < 0.0001$) while no significant difference in the ALP concentration was observed in the CG specimens over time ($p > 0.05$).

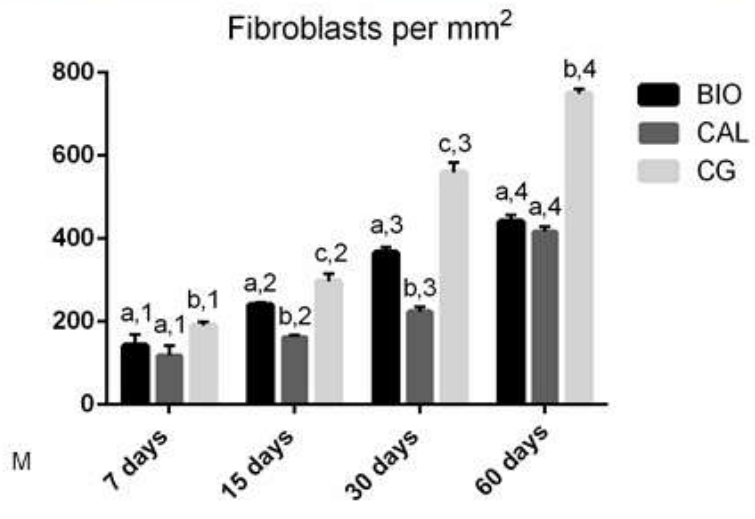
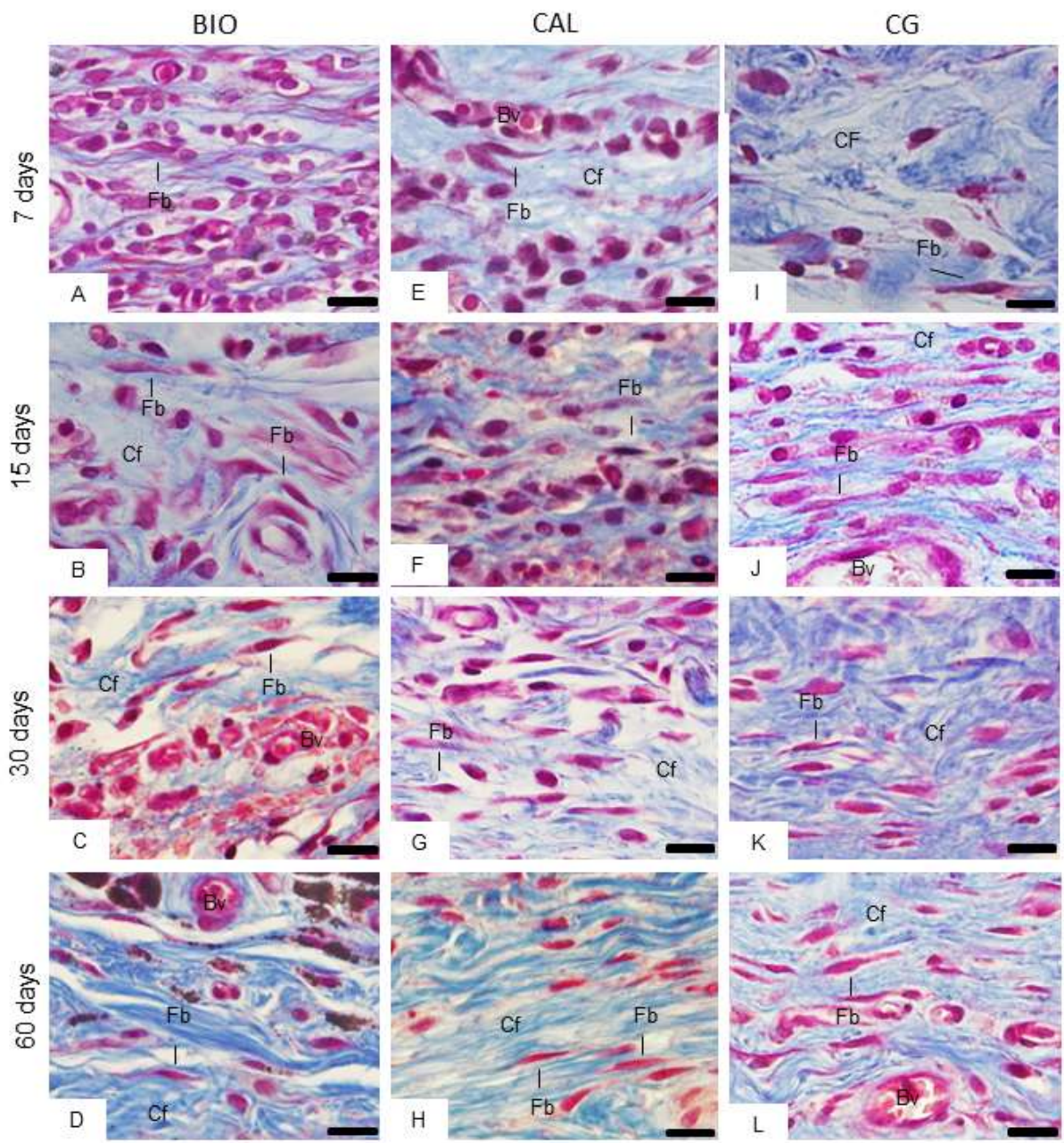
Histological features and number of fibroblasts in the capsules

The analysis of sections stained with Masson's trichrome (2A- 2L) showed some changes in the cellular population and extracellular matrix components from capsules adjacent implants over time. After 7 days, the capsules contained few fibroblasts among many inflammatory cells. Over the course of 15 and 30 days, a decrease in the number of inflammatory cells in parallel to an increase in the number of fibroblasts and bundles of collagen fibres, stained in blue, were observed. At 60 days, the capsules exhibited mainly fibroblasts intermingled with an enhanced content of thick collagen fibre bundles compared to those seen at 7 days.

According to Figure 2M, the quantitative analysis of the capsules of all groups revealed a gradual and significant increase in the numerical density of fibroblasts ($p < 0.0001$). At 7 and 60 days, there was no significant difference in the number of fibroblasts between BIO and CAL groups ($p = 0.0703$). In contrast, at 15 and 30 days, the number of fibroblasts was greater in BIO group than in CAL specimens ($p < 0.0001$). In all the periods, the greatest values of fibroblasts were observed in the CG specimens ($p < 0.0001$).



Figures 1A- 1C - Figures 1A- 1C - Graphs showing the values (expressed as mean $\pm$ standard deviation) of the concentration of calcium (A), phosphorus (B) and alkaline phosphatase (C) in the serum of the Bio-C Temp (BIO), Calen (CAL) and CG specimens at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).



Figures 2A-2L - Photomicrographs showing portions of the capsules adjacent to the opening of the implanted tubes of the BIO (A-D), CAL (E-H) and CG (I-L) groups show an increase in fibroblasts (arrows) and collagen fibers (in blue) over time. Fb, fibroblasts; Bv, blood vessels; Cf, collagen fibers. Masson's trichrome. Bars: 18 μm . **Figure 2M** – Graphic showing the number of fibroblasts per mm^2 (expressed as mean $\pm$ standard deviation) from BIO, CAL and CG groups at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).

OCN and OPN immunoexpression in capsules

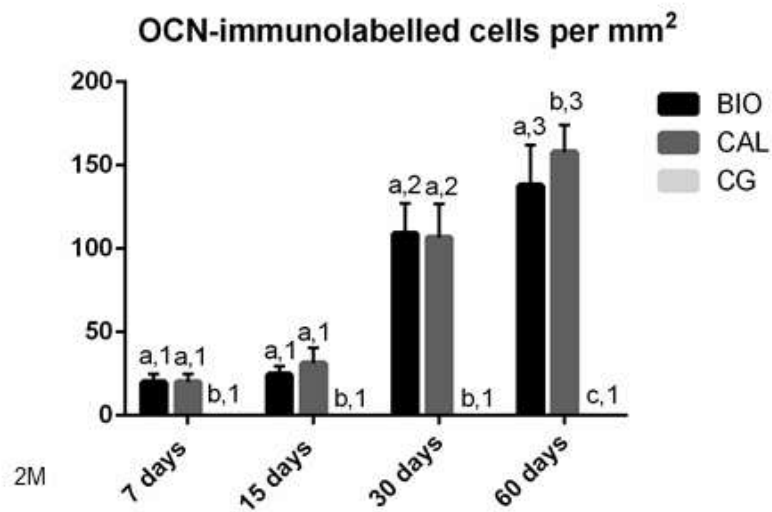
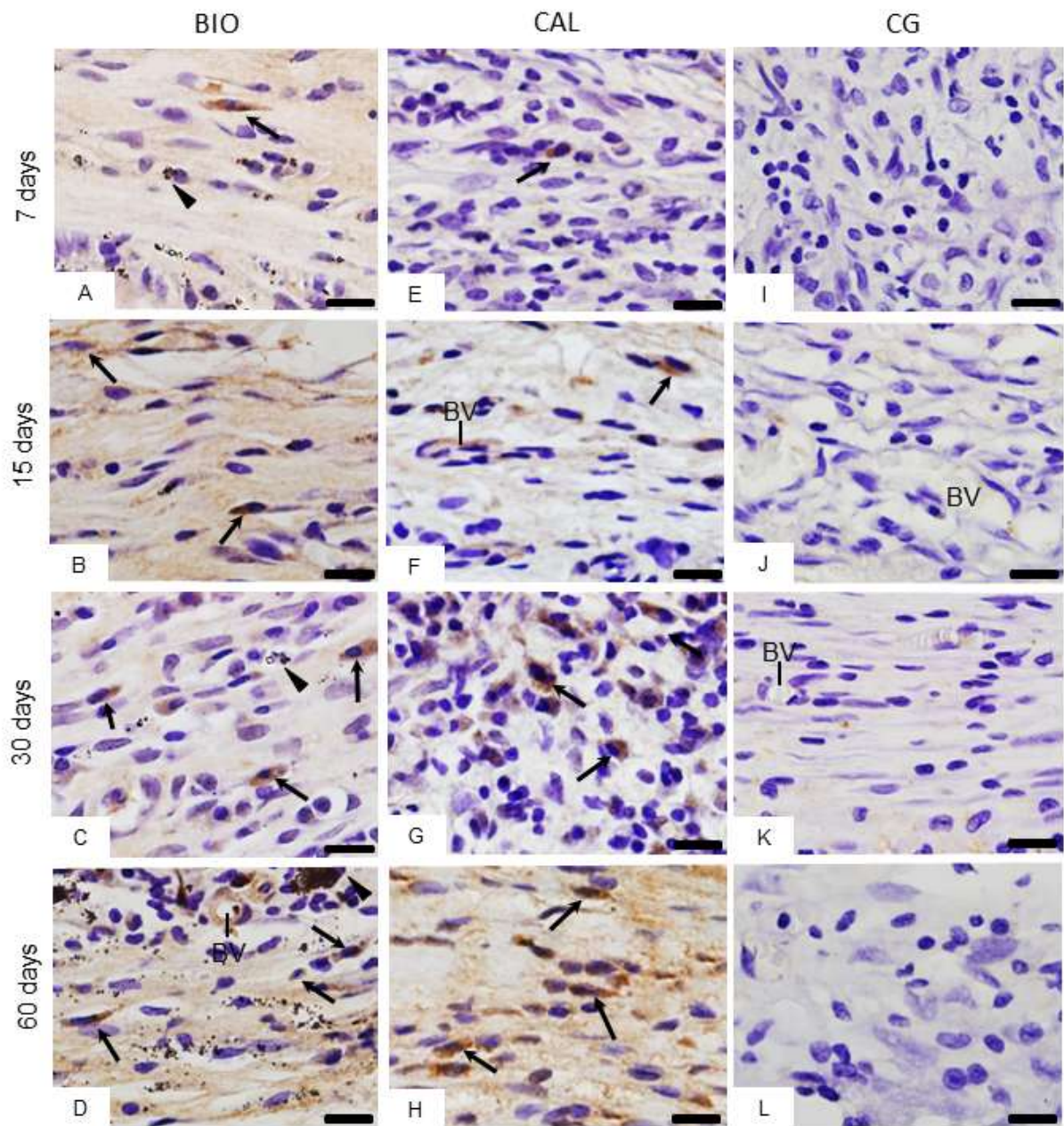
The sections submitted to immunohistochemical reactions for detection of OCN (Figs. 3A-3H) and OPN (Figs. 4A-4H) showed immunostained cells (brown/yellow colour) in the capsules of BIO and CAL specimens, in all periods. The capsules around the medications contained some elliptical and round shaped cells with strong OCN (Figs. 3A-3H) and OPN (Figs. 4A-4H) immunolabelling in their cytoplasm. OCN- and OPN-immunolabelled cells were not observed in the CG specimens (Figs. 3I-3L and 4I-4L, respectively).

The quantitative analysis of the number of OCN- and OPN-immunopositive cells (Fig. 3M and 4M, respectively) revealed that there were no significant differences between the BIO and CAL groups at 7, 15 and 30 days ($p > 0.05$). However, at 60 days the number of OCN- and OPN-immunolabelled cells was greater in the CAL than in BIO specimens ($p < 0.0001$). From 7 to 15 days, no significant difference was observed in the number of OCN- and OPN-immunolabelled cells in the BIO and CAL specimens, but the number of immunolabelled cells increased significantly from 15 to 30 days ($p < 0.0001$) and from 30 to 60 days ($p < 0.0001$) in both groups. In contrast, no significant difference was detected in the CG specimens over time.

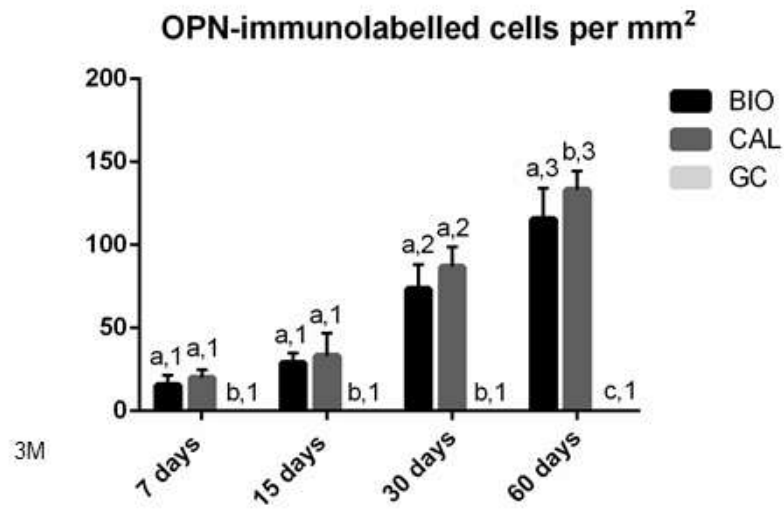
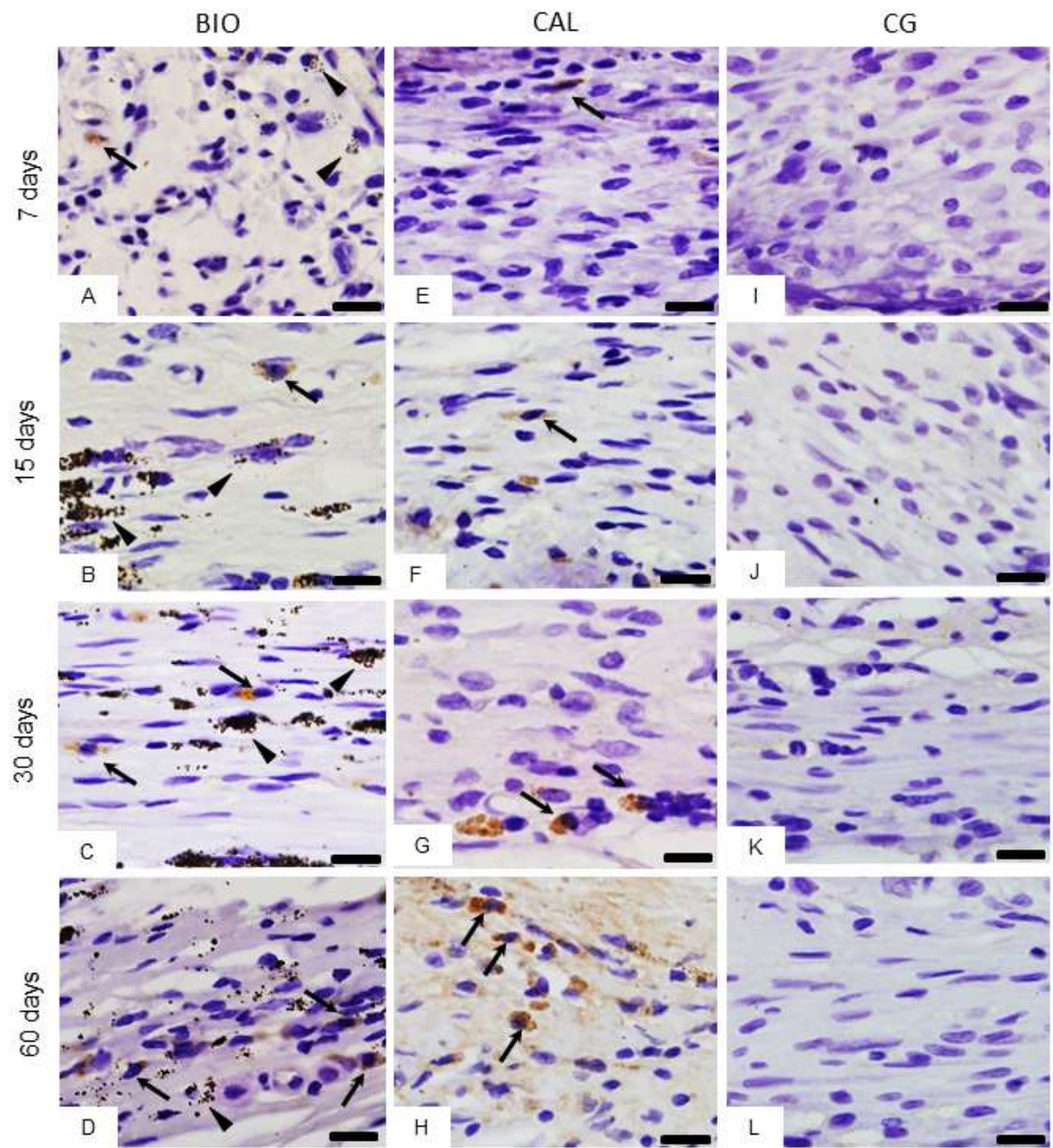
von Kossa histochemical reaction and analysis of unstained sections

The sections of BIO (Figs. 5A and 5B) and CAL (Figs. 5C and 5D) implants submitted to the von Kossa histochemical method revealed positive structures (in black/brown colour) in all periods. von Kossa-positive deposits were observed dispersed between cells and collagen fibres as well as in the capsule surface (medication/connective tissue interface). von Kossa-positive deposits were not observed in the capsules of CG specimens (Figs. 5E and 5F).

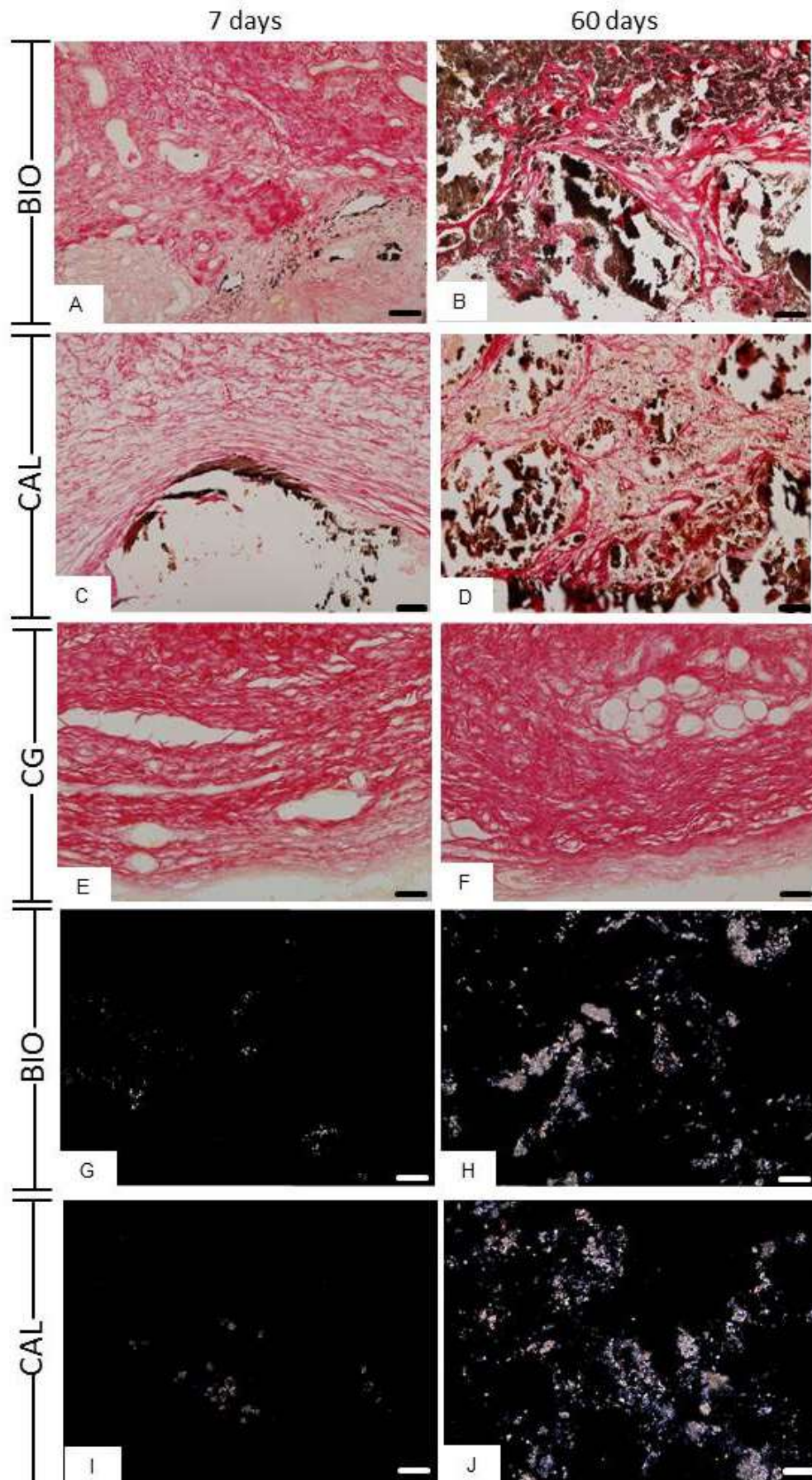
The unstained sections analyzed under polarized light revealed birefringent structures (Figs. 5G-5J) in similar regions of those observed in von Kossa reactions (Figs. 5A-5D). Moreover, no birefringent structure was seen in the CG specimens (data not shown).



Figures 3A-3L- Photomicrographs showing portions of sections submitted to immunohistochemistry for detection of OCN (in brown colour) and counterstained with haematoxylin. In BIO (A-D) and CAL (E-H) some elliptical and/or fusiform cells exhibit immunolabelling in their cytoplasm (arrows). None immunolabelled cell is observed in the CG specimens (I-L). Arrowhead: material particles. Bars: 18 μm . **Figure 3M** – Graphic showing the number of OCN-immunolabelled cells per mm^2 (expressed as mean $\pm$ standard deviation) from BIO, CAL and CG groups at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).



Figures 4A-4L - Photomicrographs showing portions of the sections submitted to immunohistochemistry for detection of OPN (in brown colour) and counterstained with haematoxylin. At 7 and 15 days, few immunolabelled cells, mainly fibroblasts, are observed in the capsules of BIO (A and B) and CAL (E and F). At 30 and 60 days, several strongly immunolabelled cells are present in the capsules of BIO (C and D) and CAL (H and K) groups. Note absence of immunolabelled cells in the capsules of CG specimens (I-L). Arrowhead: material particles. Bars: 18 μm . **Figure 4M** – Graphic showing the number of OPN-immunolabelled cells per mm^2 (expressed as mean $\pm$ standard deviation) from BIO, CAL and CG groups at 7, 15, 30 and 60 days. In each period, the comparison among the groups is indicated by superscript letters; different letters = significant difference. The superscript numbers indicate the analysis of each group over time; different numbers = significant difference. Tukey's test ($p \leq 0.05$).



Figures 5A-5J - Photomicrographs showing portions of capsules adjacent to the opening of the tubes implanted in the subcutaneous for 7 (A, C, E, G and I) and 60 days (B, D, F, H and J). **Figs. 5A-5F** - Sections submitted to the von Kossa reaction and counterstained with picrosirius-red. von Kossa-positive structures (black colour) are observed dispersed by the capsules in the BIO (A and B) and CAL (C and D) groups. In E and F, no positive structures are observed in CG. **Figs. 5G-5J** - Photomicrographs showing unstained sections analyzed under polarized light. Note the presence of birefringent structures in the BIO and CAL groups at 7 and 60 days. Bars: 52 μm .

DISCUSSION

In the present study, we evaluated whether the Bio-C Temp and Calen medications could interfere in the serum Ca^{+2} , P^- and ALP levels since these ions (Ca^{+2} and P^-) and ALP enzyme are essential for biomineralization.^{15,26,28} Considering that BIO and CAL medications did not contain phosphorous ions, it is difficult to explain the accentuated serum P^- levels observed in these groups in comparison with CG specimens after 7 days of implantation in the subcutaneous tissues. However, it is known that the calcium silicate materials release Ca^{2+} into the extracellular fluid, which react with the phosphate ions from body fluids precipitating calcium phosphate. Thus, the increase in the calcium phosphate precipitate leads to an increase in phosphorus ions, which tends to decrease over time. At 7 days, an increase in the serum P^- levels was also reported due to Gray and White MTA implantation into subcutaneous tissue of rats.²⁶ It is possible that the intracanal medication cause changes in the P^- reabsorption from glomerular filtrate culminating in an imbalance that must be soon reestablished, since at 15 days changes in the serum P^- levels were not detected between intracanal medications and CG specimens. However, further studies are necessary to better investigate a possible relationship between serum P^- levels and kidney damage.

It is known that biomineralization is a complex process that depends on calcium supersaturation in the microenvironment.³³ Although both medications release calcium ions,^{19,34} significant differences in the serum calcium concentration were not observed between BIO and CG samples. At 7 and 15 days, the high serum calcium levels observed in the CAL samples in comparison with BIO and CG samples may be, at least in part, due to hydrophilic property of calcium hydroxide-based paste.³⁴ Calcium ions release depends of the material properties, particularly, solubility, network structure and permeability to water.³⁵ The increase in the serum Ca^{+2} level observed in the CAL samples may be attributed the greater dissociation of calcium hydroxide in Ca^{+2} ions. Calen has a higher amount of calcium hydroxide molecules than Bio-C Temp.²³ The calcium hydroxide in Bio-C Temp are derived from silicate calcium that in the presence of moisture gives rise to calcium hydroxide, which dissociates in OH^- and Ca^{+2} .¹⁹

On the other hand, BIO and CAL medications promoted a significant increase in the serum ALP concentration until the 30th day, indicating that these medications may favor the biomineralization. ALP is responsible for release of inorganic phosphate in alkaline microenvironment and is highly expressed during the formation of mineralized tissues. Thus, this enzyme is considered as a marker for osteogenic activity.³⁶

The morphological and morphometrical analyses of capsules around the medications

revealed a significant increase in the number of fibroblasts concomitant to the formation of collagen fibres, indicating that cellular and extracellular matrix damage is reduced over time. This hypothesis is reinforced since a significant increase in the number of OCN- and OPN-immunolabelled cells was also seen in the capsules around BIO and CAL specimens over time. OCN and OPN are non-collagenous proteins of mineralized tissue matrix and, therefore, are markers of cells associated to mineralized tissues.²⁶ OCN acts in the biomineralization and homeostasis³⁷ and OPN modulates the adhesion, migration and differentiation of odontoblast progenitor cells, and participates in the tissue repair process.³⁸ There are evidences that the beginning of the biomineralization is correlated with the increased release of calcium ions according to OPN expression.³⁹ Considering that no immunoreactivity was detected in the CG specimens for both proteins, it is conceivable to assume that Bio-C Temp and Calen medications induced the production of osteogenic proteins in the cells of the subcutaneous connective tissue.

Although calcium hydroxide is not present in the composition of Bio-C Temp, the calcium silicate-based materials induce the mineralization due to the formation of calcium silicate gel and calcium hydroxide, in consequence, to its hydration,²⁷ releasing calcium and hydroxyl ions, and increasing the pH of the medium.¹⁹ After 7 days, there is evidence showing that Bio-C Temp provides pH around 10.79.¹⁹ The alkaline pH and calcium ions stimulate the repair by deposition of mineralized tissue.² However, the CAL paste has polyethylene glycol in the vehicle, which has a high molecular weight that allows a slow release of calcium and hydroxyl ions, maintaining its action for a long time. It has been suggested that when calcium hydroxide is associated with a viscous vehicle, the release of calcium ions can occur for longer period.² Here, no significant alteration in the serum calcium levels promoted by Calen (calcium hydroxide-based paste) was seen at 30 and 60 days, indicating that the calcium released is not able to cause changes in serum levels. It is feasible that calcium and hydroxyl ions released for a long time may be responsible for enhanced immunoexpression of OCN and OPN observed in the calcium hydroxide-based paste specimens at 60 days. However, it is important emphasize that, from 30 to 60 days, a significant increase in the immunoexpression for OCN and OPN was also observed in BIO specimens, pointing to the bioactive potential of this bioceramic medication.

At all periods, von Kossa-positive structures, indicative of calcium ions precipitation, were observed in the capsules around BIO and CAL specimens. Moreover, the birefringent structures were seen in the capsules from unstained sections, suggesting the deposition of amorphous calcite.^{15,30,31,40} It is known that calcium deposits revealed by von Kossa

histochemical reaction as well as birefringent calcite are originated from chemical composition of materials.¹ Since elevated concentration of calcium ions is essential in the biomineralization process, the presence of von Kossa-positive structures and birefringent calcite deposits indicates that these medications present bioactive potential.^{23,26,27} This idea is reinforced by the fact that either von Kossa-positive structures or birefringent deposits were not observed in the capsules of CG specimens. These findings are in accordance with other studies carried out in subcutaneous tissues evaluating a calcium hydroxide-based paste^{27,35} and calcium silicate endodontic sealers.^{14,15,25,30,31} Thus, our results suggest that bioceramic intracanal medication (Bio-C Temp) has bioactive potential.

Biomineralization is one important challenge facing endodontics.⁴¹ Thus, there is a consensus that an endodontic material may be bioactive to promote tissue connective repair and hard tissue-like formation.⁴² The bioactive potential of an endodontic material is an important property to achieve biological sealing⁴³ and periapical tissues repair.⁴⁴ Therefore new biomaterials for bone and bone tissue engineering applications⁴⁵. Bio-C Temp was able to induce the precipitation of structures containing calcium as detected by von Kossa histochemical method culminating in the calcite amorphous precipitation detected under polarized illumination of unstained sections. Moreover, Bio-C Temp medication, similarly to calcium hydroxide-based paste, induced the synthesis of osteocalcin and osteopontin, typical proteins of mineralized tissues. The bioceramic Bio-C Temp medication also promoted an increase in serum ALP levels, an essential enzyme for the biomineralization process. Therefore, it is expected that Bio-C Temp, when in contact with periapical tissues, can induce tissue and bone repair. However, further studies are needed to evaluate whether Bio-C Temp regarding its removal and possible influence of the residual material with the root canal sealer.

CONCLUSION

In the present study, Bio-C Temp, likewise Calen, caused an increase in the levels of ALP, an essential enzyme for biomineralization process, and induced the production of osteocalcin and osteopontin by subcutaneous connective tissue cells as well as the deposition of calcite, suggesting that Bio-C Temp has bioactive potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mr. Pedro Sérgio Simões for kind help and technical assistance. We thank São Paulo State Research Foundation (FAPESP: 2018/16848-2), National Council for

Scientific and Technological Development (CNPq) and CAPES (code 001) for the financial support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors deny any conflict of interests to this study.

REFERENCES

- 1- Holland R, Gomes JE Filho, Cintra LTA, Queiroz ÍOA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *J. Appl. Oral Sci.* 2017; 25: 465-476.
- 2- Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int. Endod. J.* 2011;44(8):697-730.
- 3 - Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz. Dent. J.* 1995;6:85-90.
- 4- Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int. Endod. J.* 2008;41:933-938.
- 5- Alsubait S, Alsaad N, Alahmari S, Alfaraj F, Alfawaz H, Alqedairi A. The effect of intracanal medicaments used in Endodontics on the dislocation resistance of two calcium silicate-based filling materials. *BMC Oral Health.* 2020;20:57.
- 6- Estrela C, Decurcio DA, Rossi-Fedele G, Silva JA, Guedes OA, Borges ÁH. Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials. *Braz. Oral Res.* 2018; 32: e73.
- 7- Pereira AC, Oliveira ML, Cerqueira-Neto ACCL, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Treatment outcomes of pulp revascularization in traumatized immature teeth using calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel as intracanal medication. *J. Appl. Oral Sci.* 2020;28:e20200217.
- 8- Kahler SL, Shetty S, Andreasen FM, Kahler B. The effect of long-term dressing with calcium hydroxide on the fracture susceptibility of teeth. *J. Endod.* 2018;44:464-469.
- 9- Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, et al. Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *ISRN Dent.* 2012;2012:904963.
- 10- Zare Jahromi M, Kalantar Motamedi MR. Effect of calcium hydroxide on inflammatory root resorption and ankylosis in replanted teeth compared with other intracanal materials: a review. *Restor. Dent Endod.* 2019;44:e32.

- 11- Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent. Mater.* 2015;31:351-370.
- 12- Giacomino CM, Wealleans JA, Kuhn N, Diogenes A. Comparative biocompatibility and osteogenic potential of two bioceramic sealers. *J Endod*; 2019;45:51-56.
- 13- Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a calcium silicate-based endodontic cement (BioRoot RCS): Interactions with human periodontal ligament cells *in vitro*. *J. Endod.* 2015;41:1469-1473.
- 14- Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an *in vivo* study in rats. *Int. Endod. J.* 2021;54:100-111.
- 15- Delfino MM, de Abreu Jampani JL, Lopes CS, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, et al. Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with White MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *Int. Endod. J.* 2021;54:1597-1613.
- 16- Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM. Physicochemical properties, cytocompatibility and antibiofilm activity of a new calcium silicate sealer. *Braz. Dent. J.* 2021;32:8-18.
- 17- Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, et al . Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014;102:4336-4345.
- 18- Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, et al. Development and evaluation of reparative tricalcium silicate-ZrO₂ -Biosilicate composites. *J Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2021;109:468-476.
- 19- Villa N, Santos VVD, Costa UMD, Mendes AT, Duarte PHM, Rosa RAD, et al. A New calcium silicate-based root canal dressing: Physical and chemical properties, cytotoxicity and dentinal tubule penetration. *Braz. Dent. J.* 2020;31:598-604.
- 20- Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A Bio-C Temp brochure. Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A. (2021) http://www.angelusdental.com/img/arquivos/2833_10502833_0111022019_bio_c_temp_bula_fechado_pdf.
- 21- Oliveira LV, da Silva GR, Souza GL, Magalhães TEA, Barbosa GLR, Turrioni AP, et al. A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. *Int. Endod. J.* 2020;53:1140-1152.

- 22- Oliveira LV, de Souza GL, da Silva GR, Magalhães TEA, Freitas GAN, Turrioni AP, et al. Biological parameters, discolouration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. *Int Endod J.* 2021;54:2133-2144.
- 23- Guerreiro JCM, Ochoa-Rodríguez VM, Rodrigues EM, Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Antibacterial activity, cytocompatibility and effect of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament on osteoblast biology. *Int. Endod. J.* 2021;54:1155-1165.
- 24- Lopes CS, Delfino MM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Hepatic enzymes and immunoinflammatory response to Bio-C Temp bioceramic intracanal medication implanted into the subcutaneous tissue of rats. *Sci. Rep.* 2022;12:2788.
- 25- Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2012;100:1773-81.
- 26- de Azevedo Queiroz IO, Mello WG, Martins CM, Dal Fabbro R, Narciso LG, Massunari L, et al. Systemic bone marker expression induced by grey and white mineral trioxide aggregate in normal and diabetic conditions. *Int. Endod. J.* 2018;51:889-900.
- 27- Cosme-Silva L, Benetti F, Dal-Fabbro R, Gomes Filho JE, Sakai VT, Cintra LTA, et al. Biocompatibility and biomineralization ability of Bio-C Pulpecto. A histological and immunohistochemical study. *Int J Paediatr Dent.* 2019;29:352-360.
- 28- Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Mogami Bomfim S, et al. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int. Endod. J.* 2020;53:1084-1092.
- 29- da Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Mast cells and immunoexpression of FGF-1 and Ki-67 in rat subcutaneous tissue following the implantation of Biodentine and MTA Angelus. *Int. Endod. J.* 2019;52:54-67.
- 30- Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci. Rep.* 2020;10:7173.
- 31 - Hoshino RA, Silva GFD, Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, et al. Physical Properties, Antimicrobial Activity and In Vivo Tissue Response to Apexit Plus. *Materials (Basel).* 2020;13:1171
- 32- Song W, Sun W, Chen L, Yuan Z. In vivo biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based bioceramics in endodontics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:580954.

- 33- Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J. Endod.* 2009;35:731-736.
- 34- Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, et al. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *J. Endod.* 2016;42:1822-1828.
- 35- Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J. Appl. Biomater. Funct Mater.* 2015;13:43-60.
- 36- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:421746.
- 37- Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J. Endod.* 2007;33:703-708.
- 38- McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc. Res. Tech.* 1996;33:141-164.
- 39- de Araújo Lopes JM, Benetti F, Rezende GC, Souza MT, Conti LC, Ervolino E, et al. Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. *Int. Endod. J.* 2020;53:1494-1505
- 40- Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J. Endod.* 1999;25(3):161-166.
- 41- Jiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2019;107:2109-2120
- 42- Niu LN, Jiao K, Wang TD, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE, et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *J. Dent.* 2014;42:517-533.
- 43- Holland R, Mazuqueli L, de Souza V, Murata SS, Dezan Júnior E, Suzuki P. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. *J. Endod.* 2007;33:693-697.

- 44- Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo Rde T, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J. Endod.* 1993;19:348-352.
- 45- Fei L, Wang C, Xue Y, Lin K, Chang J, Sun J. Osteogenic differentiation of osteoblasts induced by calcium silicate and calcium silicate/ β -tricalcium phosphate composite bioceramics. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2012;100:1237-1244

3.3 Publicação 3*

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF A CALCIUM SILICATE INTRACANAL MEDICATION: BIO-C TEMP

Abstract

Aim: To evaluate the physicochemical properties a calcium silicate intracanal medication, Bio-C Temp (Angelus, Londrina, Brazil), in comparison with a calcium hydroxide-based intracanal medication (Calen, SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brazil).

Methodology: pH value was measured after immersion in distilled water (12 hours, 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days). Flow and radiopacity (mmAl) were evaluated based on the ISO 6876. Solubility was evaluated by mass loss (%) after 7 and 30 days of immersion in distilled water or sodium phosphate buffer (PBS). Volumetric change and fillability (by micro-computed tomographic) were assessed after immersion in PBS. Data were submitted to ANOVA and Tukey's or Student's t test ($\alpha = 0.05$).

Results: Bio-C Temp presented lowest values for pH, flow, volumetric change, and weight loss after 14 days of immersion in distilled water and 7 and 14 days in PBS ($p < 0.05$) and significantly greater values of radiopacity and filling capacity ($p < 0.05$) than Calen. Both medications showed lower solubility when immersed in PBS ($p < 0.05$).

Conclusion: Despite the bioceramic medication presenting less volumetric loss and satisfactory filling capacity, avoiding voids and failures, Bio-C Temp showed lower alkalinity of the medium compared to Calen.

Keywords: calcium silicate; endodontics; intracanal medication; physicochemical properties; X-ray microtomography.

* Artigo em fase de elaboração para posterior submissão no *Intenational Journal Endodontics*.

INTRODUCTION

Calcium hydroxide-based pastes have been widely used as intracanal medication in different endodontic conditions (Alsubait *et al.* 2020). These medications are indicated as an antimicrobial agent, optimizing the disinfection of the root canal system and complementing the disinfection promoted by biomechanical preparation (Ricucci *et al.* 2010). Moreover, calcium hydroxide-based pastes are also recommended in cases where there is a need for formation and repair of mineralized tissue (Estrela *et al.* 2018, Alsubait *et al.* 2020), such as after dental trauma (Alsubait *et al.* 2020), control of root resorption, for treatment of extensive periapical lesions, apexifications, perforations (Estrela 1995), and during pulpotomy (Mohammadi, Dummer 2011).

Calcium hydroxide stands out due to the fact that it has antimicrobial action and excellent biological properties (Holland *et al.* 2017). The action of calcium hydroxide is due to the ionic dissociation of calcium and hydroxyl ions (Estrela *et al.* 2018), as it provides an alkaline environment, which stimulates the formation of mineralized tissue (Mohammadi, Dummer 2011) and favors its antimicrobial action (Guerreiro *et al.* 2021). Calen paste (SS White Dental Articles, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) is a calcium hydroxide-based intracanal medication associated with a viscous vehicle, polyethylene glycol 400, that presents biocompatibility (Andolfatto *et al.* 2012; Lopes *et al.* 2022). This paste provides the microenvironment with an alkaline pH canal (Zancan *et al.* 2016), has antimicrobial action (Guerreiro *et al.* 2021; Lima *et al.*, 2012) and is capable of inactivating bacterial endotoxin (Tanomaru *et al.* 2003). Moreover, Calen paste is biocompatible (Andolfatto *et al.* 2012; Lopes *et al.* 2022), capable of inducing the deposition of mineralized nodules (Guerreiro *et al.* 2021) and is able to promote the formation of mineralized tissue (Leonardo *et al.* 1993).

Although calcium hydroxide-based medication has adequate biological properties (Guerreiro *et al.* 2021; Lopes *et al.* 2022), the paste inside the root canal for prolonged time

can affect the mechanical properties of root dentin due to collagen degradation (Alsubait *et al.* 2020). There are evidence that the alkalinity of calcium hydroxide-based medication can weaken the root (Kabler *et al.* 2018) increasing the susceptibility to fracture (Dudeja *et al.* 2015). Furthermore, calcium hydroxide-based medications are permeable to tissue fluids and soluble in the root canal (Segato *et al.* 2016).

Bioceramic endodontic materials have been highlighted for being bioactive (Zare Jahromi *et al.* 2019), due to the material's interaction with dentin, forming an intermediate mineralized zone in the presence of moisture (Prati, Gandolf 2015), besides its biocompatibility (Delfino *et al.* 2021; Silva *et al.* 2021). Calcium silicate-based materials are routinely used in Endodontics in procedures involving pulp regeneration and hard tissue repair as well as root canal filling materials (Dawood *et al.* 2017).

Therefore, new calcium silicate-based materials are constantly being developed (Villa *et al.* 2020). Bio-C Temp (Angelus, Londrina - PR, Brasil) is a bioceramic intracanal medication based on calcium silicates associated with calcium tungstate and titanium oxide, used as radiopacifier agents, in addition to calcium aluminate, calcium oxide and base resin as a vehicle (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A 2021). According to the manufacturer, Bio-C Temp is indicated for endodontic treatment, retreatment, in teeth with incomplete root formation, root perforations and external and internal resorption, prior to the use of filling or repair material, besides eliminates the need for new applications, different from calcium hydroxide-based medications that require front changes. Bio-C Temp can also be used in cases of pulpotomy (Oliveira *et al.* 2020) and endodontic regeneration (Guerreiro *et al.* 2021).

This bioceramic medication showed a non-cytotoxic effect when diluted extracts were added on fibroblasts (Villa *et al.* 2020), human dental pulp cells (hDPCs) (Oliveira *et al.* 2020; Oliveira *et al.* 2021) and Saos-2 cells (Guerreiro *et al.* 2021). An *in vitro* study

suggested that this medication has osteogenic potential (Guerreiro *et al.* 2021) Furthermore, Bio-C Temp is biocompatible and did not promote changes in the hepatic enzymes in rats following subcutaneous implants (Lopes *et al.* 2022). It has been demonstrated that this bioceramic medication is radiopaque (Oliveira *et al.* 2020; Oliveira *et al.* 2021; Villa *et al.* 2020), provides a alkaline pH and releases calcium ions to the microenvironment (Oliveira *et al.* 2021; Villa *et al.* 2020) However, Bio-C Temp has low antibacterial and antibiofilm activity against *Enterococcus faecalis* through direct contact and crystal violet tests (Guerreiro *et al.* 2021).

Studies evaluating the physicochemical properties are relevant to predict the clinical behavior of medications (Zancan *et al.* 2016). Therefore, the aim of this study was to evaluate the pH, radiopacity, flow, solubility and volumetric changes and filling capacity by micro-computed tomography (micro-CT) of Bio-C Temp in comparison with Calen, a calcium hydroxide-based intracanal medication. The null hypothesis was that there would be no difference in the physicochemical properties between the Bio-C Temp and Calen intracanal medications.

MATERIAL AND METHODS

The intracanal medication used in this study and their respective manufacturers and composition are described in Table 1.

Table 1- Intracanal medications and chemical composition

Intracanal medications	
Calen*	Calcium hydroxide + zinc oxide + polyethylene glycol 400 + colophony
BIO-C TEMP**	Calcium silicates + calcium aluminate + calcium oxide + calcium tungstate + titanium oxide + base resin

*SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brazil, ** Angelus, Londrina, Brazil

pH

Polyethylene tubes measuring 10 mm length and 1.6 mm internal diameter were filled with the medications (n = 10/group), immersed in 10 mL of distilled and deionized water, and stored at 37 °C. The pH of the solutions was measured using a digital pHmeter (Digimed, SP, Brazil) after 12 hours, 1, 7, 14, 21 and 28 days of immersion at room temperature (at 25°C). Bottles containing only distilled and deionized water were used as control. The mean pH value (in triplicate) in each experimental period was calculated.

Radiopacity

Acrylic resin molds with cavities 10 mm in diameter and 1 mm deep were filled with Calen or Bio-C Temp (n=6/group). The medications were inserted into rings measuring 10 mm internal diameter and 1 mm length (n=6/group). The molds filled with medications and an aluminum scale with variable thickness (2 to 16 mm, in 2 mm increments) were positioned on occlusal radiographic films (Insight - Kodak Comp, Rochester, NY). A GE 1000 X-ray unit (X-ray Appliance GE 1000 - General Electric, Milwaukee, WI USA) adjusted at 60 kV, 7 mA, 0.32 pulses per second with a focus-film distance of 33 cm was used. The films were processed, digitized and evaluated using the UTHSCSA ImageTool for Windows version 3.00 software to determine the radiopacity equivalence of the medications in millimeters of aluminum.

Solubility

The polyethylene tubes (n = 6/group) measuring 10 mm length and 2 mm internal diameter were filled with the medications, Bio-C Temp and Calen, and stored in an oven at 37 °C. After 24 hours, the samples were weighed using an electronic analytical balance (OHAUS Adventurer[®], Nova Jersey, USA). The tubes were placed in bottles containing 7.5 mL of distilled and deionized water and maintained in an oven at 37°C, for 7 and 14 days (n = 6 samples of each group per period). Afterwards, the tubes were kept in a dehumidifier containing silica and weighed until they attained final mass stability. Mass loss was calculated

from difference between initial and final mass and the value was expressed in percentage (Zordan-Bronzel *et al.* 2021). This analysis was also made by immersion of polyethylene tubes filled with Bio-C Temp or Calen in phosphate-buffered saline solution (PBS), as described by Torres *et al.* (2019).

Flow

The flow analysis was evaluated in accordance with the International Standard Organization (ISO 6876.) Using a graduated syringe, 0.05 mL of Bio-C Temp and Calen were placed in the center of a glass plate (n = 10/group). Then, another glass plate (20 g) was placed on the plate and a weight of 100 g was added on the upper plate for 10 minutes. After this period, the maximum and minimum diameter of the material in the plate was measured. In the case of a difference between diameters of less than 1 mm, the mean was used for the test.

Volumetric change and filling capacity

The sample size for this study was calculated with G*Power 3.1.7 for Windows program (Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany), and the ANOVA test was used with an alpha-type error of 0.05 and a beta power of 0.95 for all the variables. Previous studies using micro-CT imaging determined the specific effect size for filling capacity (1.71) (Oh *et al.* 2016) and volumetric change (3.11) (Torres *et al.* 2020). The resulting sample size was 4 teeth per group. Therefore taking into consideration the risk of tooth loss during the methodology, a sample of 6 teeth per group was stipulated.

This study was approved by the Research Ethics Committee (#5.323.273; CAAE nº 11714518.3.0000.5416). Previously stored in 0.1% thymol solution at 5°C twelve mandibular premolars were selected after radiographs that were taken in both buccolingual and mesiodistal directions. Teeth presenting apical curvature, two root canals, previous endodontic treatment, external or internal root reabsorption and root canals allowing introduction of an instrument exceeding ISO size 10 to the apical foramen were excluded.

The crowns were removed with a double diamond disc (KG Sorensen, Sao Paulo, SP, Brazil) and the root length was standardized at 15 mm and working length (WL) of the tooth was determined 1 mm short of the apical foramen (14 mm). The canal was explored with a manual instrument K#10-type file (Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland). The root canals were prepared with Easy ProDesign Logic instruments (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, MG, Brazil) 25./01, 25./06 and lastly 40./04 driven by an electric motor (VDW.SILVER, VDW, Munich, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions, up to the WL (Pivoto-João *et al.* 2020).

During the preparation, the specimens were irrigated with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) using a 5 mL syringe with a NaviTip 30-G needle (Ultradent Products Inc., South Jordan, USA) up to 2 mm short of the WL. Final irrigation was performed with 5 mL of 2.5% NaOCl, followed by 2 mL of 17% EDTA and 5 mL of physiological solution (Tavares *et al.* 2021). Then, the canals were dried with absorbent paper points.

Initial scanning by micro-CT (SkyScan 1176. Bruker, Kontich, Belgium) was performed for standardization of Bio-C Temp and Calen groups by average value of the root canals volume. This first scanning followed the parameters: 80 kV voltage, 300 mA current, 35 µm voxel size, copper and aluminum (Cu + Al) filter, and 360° rotation. The volume of the root canal of each tooth were calculated and with stratified random sampling (Santos-Junior *et al.* 2020), the teeth were distributed into 2 groups according to medication (Bio C -Temp and Calen) (n=6/groups).

The canals were then filled with intracanal medications in accordance with the manufacturer's instructions. The samples were scanned again after filling and after 14 days of immersion in PBS, using 9 µm voxel size. The reconstruction of the images was performed using NRecon software (V1.6.10.4, Bruker-MicroCT) after determining the parameters for smoothing, beam hardening, and ring artefacts for each intracanal medication. The

reconstructed images were superimposed on the different time points for geometric alignment using Dataviewer software (V1.5.2.4; Bruker). The 3D images were used for quantitative analysis of the samples using CTAn software (V1.15.4.0; Bruker-micro-CT). The filling capacity of the intracanal medications was percentage of total volume of the samples immediately after filling of the root canal whereas volumetric change (%) was calculated the following formula [Volumetric change = (final volume x 100/initial volume) - 100]. Tridimensional images were made using CTVox software (v.3.2, Bruker-microCT).

Statistical analysis

All data was analyzed with GraphPad Prism 6.01 statistical program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, United States). The pH and solubility values obtained were submitted to one-way ANOVA variance analysis, followed by Tukey's test. Radiopacity, flow, volumetric change and filling capacity values were submitted to Student's t test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

According to Table 2, Bio-C Temp had greater radiopacity ($p < 0.0001$) and filling capacity ($p = 0.0327$) than the Calen paste. Otherwise, volume loss and flow were significantly greater in the Calen than in Bio-C Temp ($p = 0.0181$ and $p = 0.0030$, respectively). Figure 1 illustrates the filling capacity and volume loss after 14 days of immersion in PBS.

Table 2 – Radiopacity (mm Al), flow (mm), volumetric change (%) and filling capacity (%) of Bio-C Temp and Calen medications (Mean and Standard Deviation)

Test	Bio-C Temp	Calen
Radiopacity (mm Al)	2.84±0.11 ^a	1.78±0.45 ^b
Filling capacity (%)	92.35±1.07 ^a	88.41±1.28 ^b
Flow (mm)	19.29±1.48 ^b	23.43±0.28 ^a
Volumetric change (%)	-27.12±2.12 ^b	-34.38±1.59 ^a

Different letters on the same line represent a significant difference between intracanal medications ($p < 0.05$).

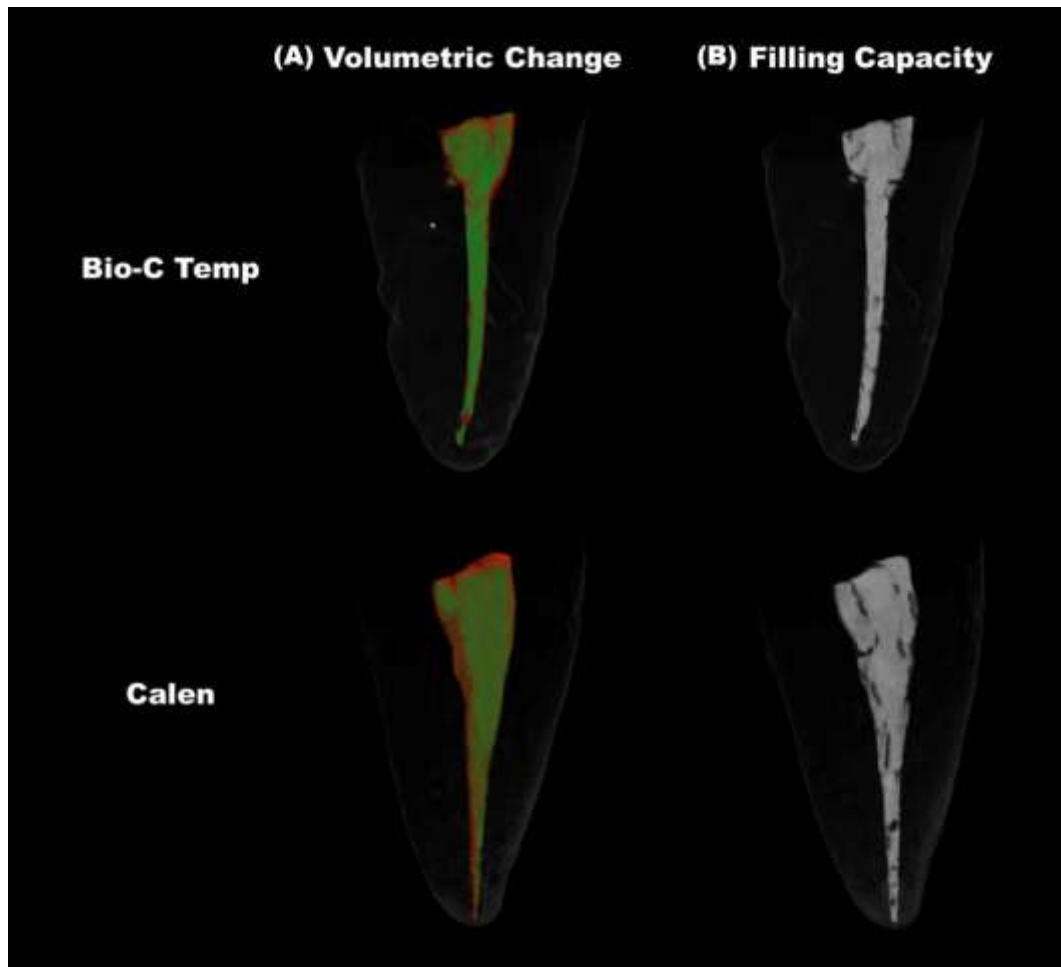


Figure 1 - Three-dimensional reconstructions of mandibular premolars filled with Bio-C Temp and Calen. A. Overlaying the volume of Bio-C Temp and Calen before (red) and after (green) immersion in PBS for 14 days. Red areas represent volume loss. B. Fillability of Bio-C Temp or Calen. Medication in gray and failures in black.

Although both materials showed alkalization ability (Table 3), the medium containing Bio-C Temp had pH values significantly lower than Calen ($p < 0.0001$), in all periods. After 24 hours, the immersion medium with Bio-C Temp exhibited pH values greater than 10.0 whereas, from 3 to 28 days, the solutions presented pH values above 9. The highest values were observed in medium containing Calen paste with pH above 11, in all periods.

Table 3 – pH values (mean and standard deviation) of Bio-C Temp, Calen and Control in the time points

Periods	Bio-C Temp	Calen	Control
12 h	10.35±0.19 ^a	11.41±0.10 ^b	6.62±0.10 ^c
1 days	10.11±0.16 ^a	11.07±0.11 ^b	6.69±0.17 ^c
3 days	9.87±0.87 ^a	11.40±0.74 ^b	6.56±0.14 ^c
7 days	9.86±0.95 ^a	11.45±0.66 ^b	6.48±0.41 ^c
14 days	9.40 ±0.78 ^a	11.49±0.34 ^b	6.28±0.14 ^c
21 days	9.32 ±1.13 ^a	11.30±0.75 ^b	6.33±0.23 ^c
28 days	9.59±0.48 ^a	11.48 ±1.07 ^b	6.26± 0.18 ^c

In the line, different superscript letters represent significant difference among groups in the same period ($p < 0.05$).

As shown in Table 4, both intracanal medications had mass loss after immersion in distilled water and PBS for 7 and 14 days. Bio-C Temp had lower mass loss than Calen ($p < 0.05$), except after immersion in distilled water for 7 days, when significant differences in the mass loss were not detected between Bio-C Temp and Calen pastes ($p > 0.05$). Regarding the immersion solution, the mass loss of Bio-C Temp was significantly lower when immersed in PBS than in distilled water, at 7 and 14 days. In Calen, a lower mass loss in PBS medium than distilled water was only observed at 14 days ($p < 0.05$).

Table 4 – Values (%) of mass loss (mean and standard deviation) of Bio-C Temp and Calen after immersion in distilled water and PBS

Immersion medium and time points	Bio-C Temp	Calen
Distilled water - 7 days	14.87±1.79 ^{Aa}	17.96 ± 2.44 ^{Ba}
PBS - 7 days	9.72 ± 0.93 ^{Bb}	14.22 ± 2.38 ^{Ba}
Distilled water - 14 days	17.23±1.02 ^{Ab}	22.00 ± 3.07 ^{Aa}
PBS - 14 days	11.53±1.22 ^{Bb}	15.56± 1.54 ^{Ba}

Different capital letters in the same column represent significant differences detected in the MIC after immersion in different solutions for 7 and 14 days. Different lowercase letters in the line represent difference between MICs in the same period ($p < 0.05$).

Discussion

The present study compared the physicochemical properties of medications based on calcium silicate (Bio-C Temp) and calcium hydroxide (Calen), the hypothesis tested was rejected, since significant differences were observed between the medications.

In all periods, Calen paste was the medication that provided the highest pH to the medium, which ranged from 11.04 to 11.49, remaining practically unchanged until 28 days. A study comparing the pH of Bio-C Temp to Ultracal XS (UltraDent Product, Inc., Indaiatuba, SP, Brazil), a medication based on calcium hydroxide, associated with an aqueous vehicle, also found greater alkalinity for the paste based on calcium hydroxide after 1, 24 and 72 hours (Villa *et al.* 2016). This difference in alkalinity can be explained by the dissociation of calcium hydroxide giving rise to hydroxyl ions that are responsible for significant increase in the pH levels (Estrela *et al.* 1999), in addition to calcium ions (Mohammadi & Dummer 2011). Although Bio-C Temp in contact with fluids/water give rises to calcium silicate hydrate and calcium hydroxide (Villa *et al.* 2016), which also dissociates in hydroxyl ions providing an alkaline pH to the medium, the amount of calcium hydroxide available by calcium silicate-based materials may be lower than those provided by Calen and Ultracal XS (Guerreiro *et al.* 2021).

The vehicles associated with medications may determine different ionic dissociation (Camargo *et al.* 2006). Calen paste has in its composition the viscous polyethylene glycol vehicle, which allows the release of calcium and hydroxyl ions slowly and for longer periods than materials manufactured with aqueous vehicle (Ballal *et al.* 2010). Bio-C Temp presents base resin as vehicle which allows better insertion of the bioceramic paste into the root canals (Cosme-Silva *et al.*, 2019). Ions release may be related to solubility of the material (Zancan *et al.* 2016; Vertuan *et al.* 2018) and weight loss of the material (Zancan *et al.* 2016). Therefore, the low amount of hydroxyl ions found in the medium containing Bio-C Temp may be due to

reduced solubility of this medication in comparison to the Calen. Moreover, the reduced solubility of Bio-C Temp may be responsible for the lowest volumetric change of this medication, as observed in the present study.

Solubility indicates the mass loss of the material after solution immersion (Versiani *et al.* 2016). Considering that intracanal medication is an endodontic material that does not set, the medications were inserted in polyethylene tubes with an internal diameter that allowed a greater contact of the material with the solutions to evaluate its solubility; the polyethylene tubes were filled with the medications without overflowing and, immediately, immersed into the solutions. Here, solubility of medications was evaluated after immersion in distilled water and PBS, since there is a consensus that distilled water does not express the actual condition of the materials *in vivo*. Thus, the PBS is considered a medium that better mimics the physiological condition (Moraes *et al.* 2022; Torres *et al.* 2020). In addition, the solubility evaluation at 7 and 14 days was performed to simulate endodontic treatment, since intracanal medication is a temporary material used between sessions. Our findings showed clearly that the medium interferes with solubility of intracanal medications, since the Bio-C Temp and Calen when immersed in distilled water presented greater mass loss than in PBS. It has been suggested that hydrophilic property of calcium hydroxide-based materials may be responsible, at least in part, for high solubility of Calen, as observed in the present study. Moreover, the high solubility of Calen leads to dissociation of calcium and hydroxyl ions providing an alkaline pH to the medium (Zordan-Bronzel *et al.* 2019). Our findings indicate that the diminished mass loss observed in Bio-C Temp may explain the lower pH values verified in Bio-C Temp.

micro-CT is a non-destructive three-dimensional analysis (Celikten *et al.* 2019) tool that complements the conventional test of solubility analysis, allowing a volumetric analysis (mm³) of materials, the filling capacity besides dimensional and morphological changes of

endodontic materials (Tanomaru-Filho *et al.* 2017). Furthermore, micro CT allows the dentin/material interface analysis, since the high resolution facilitates the visualization of defects and voids associated with failures in root canal filling (Gandolfi *et al.* 2013). Materials with lower solubility are associated with better filling capacity decrease the possibility of gap formation between root canal dentine and endodontic material (Silva *et al.* 2017). There are no studies in the literature that have evaluated the filling capacity and volumetric change of intracanal medications. However, these analyses are important because the volumetric loss of the material, as well as the presence of voids after filling the canal, prevents direct contact of the material with the bacteria, impairing the antimicrobial action, in addition to allowing bacterial reinfection inside the root canal (Zancan *et al.* 2016).

A higher flow rate can be associated with a better filling capacity of the root canal (Esberard *et al.* 1996). However, in the present study, Calen paste was the medication that presented the highest flow and lowest filling capacity. However, it is important emphasize that, in the present study, the analysis by micro-CT provides adequate and reproducible results in which allows evaluating property filling the different materials by means of filling volume (Tanomaru-Filho *et al.* 2017). Volumetric loss of calcium hydroxide paste is increased when this paste contains a viscous vehicle (Zancan *et al.* 2016, Pereira *et al.* 2019). It has been suggested that the volumetric loss may be directly associated with high amount of ions release to the miroenvironment (Mustafa *et al.* 2018). Since the release of these ions are essential for the bioactivity and antimicrobial activity of intracanal medications (Guerreiro *et al.* 2021), there must be a balance between minimal volume loss and sufficient amount of ions released to ensure these biological properties of these medications.

Here, radiopacity evaluation was based on ISO 6876:2012, developed for root canal sealers, since there is no ISO standard to evaluate the radiopacity of intracanal medication. However, the usage of an intracanal medication exhibiting radiopacity is essential for better

visualization of the filling of root canal system and maintenance of the root canal dressing into the root canal (Verma *et al.* 2018; Villas *et al.* 2020). In the present study, Bio-C Temp showed greater radiopacity compared to medication based on hydroxide, corroborating the other study (Villa *et al.*, 2020). The difference can be explained by the presence of the radiopacifiers calcium tungstate and titanium oxide in the composition of Bio-C Temp (Oliveira *et al.* 2021; Villa *et al.*, 2020), while Calen paste has only zinc oxide as a radiopacifying agent. However, in the present study, both medications had a radiopacity inferior to 3 mm Al, the minimum value that endodontic sealers may present, according to ISO 6876.

In this study, the bioceramic paste showed important physicochemical properties such as better filling capacity and radiopacity, lower volume loss and volumetric alteration than Calen. On the other hand, the alkaline pH provides by Bio-C Temp to the microenvironment was lower than by Calen, which may reduce its antimicrobial action, a desirable property in intracanal medication (Estrela 1995). Therefore, further studies as well as possible associations with Bio-C Temp are necessary to acquire greater knowledge of the clinical behavior of this material.

CONCLUSION

Despite the bioceramic medication presenting less volumetric loss and satisfactory filling capacity, avoiding voids and failures, Bio-C Temp showed lower alkalinity of the medium compared to Calen. However, further studies are needed to ensure its clinical use.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a research grant from FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2018/16848-2).

REFERENCES

- Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL *et al.* (2012) Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *International Scholarly Research Notices Dentistry* **2012**, 904963.
- Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A (2022) Bio-C[®] Temp. Retrieved from: <https://angelus.ind.br/produto/bio-c-temp> [Accessed on March 30 th, 2022].
- Alsubait S, Alsaad N, Alahmari S, Alfaraj F, Alfawaz H, Alqedairi A (2020). The effect of intracanal medicaments used in Endodontics on the dislocation resistance of two calcium silicate-based filling materials. *BMC Oral Health* **20**, 57.
- Ballal NV, Shavi GV, Kumar R, Kundabala M, Bhat KS (2010) In vitro sustained release of calcium ions and pH maintenance from different vehicles containing calcium hydroxide. *Journal of Endodontics* **36**, 862-6.
- Camargo CHR, Bernardineli N, Valera MC *et al.* (2006) Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dental Traumatology* **22**, 302–6.
- Celikten B, Jacobs R, de Faria Vasconcelos K, *et al.* (2019) Comparative evaluation of cone beam CT and micro-CT on blooming artifacts in human teeth filled with bioceramic sealers. *Clinical Oral Investigations* **23**, 3267–73.
- Cosme-Silva L, Benetti F, Dal-Fabbro R *et al.* (2019b) Biocompatibility and biomineralization ability of Bio-C Pulpecto. A histological and immunohistochemical study. *International Journal of Paediatric* **29**, 352-60.
- Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ (2017) Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* **8**, e12195.
- Delfino MM, Jampani JLA, Lopes CS, *et al.* (2021) Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with White MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *International Endodontic Journal* **54**, 1597-613.

- Dudeja C, Taneja S, Kumari M, Singh N (2015) An *in vitro* comparison of effect on fracture strength, pH and calcium ion diffusion from various biomimetic materials when used for repair of simulated root resorption defects. *Journal of Conservative Dentistry* **18**, 279-83.
- Esberard RM, Carnes DL Jr, Del Rio CE (1996) Changes in pH at the dentin surface in roots obturated with calcium hydroxide pastes. *Journal of Endodontics* **22**, 402-5.
- Estrela C, Decurcio DA, Rossi-Fedele G, Silva JA, Guedes OA, Borges ÁH (2018) Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials. *Brazilian Oral Research* **32**, e73.
- Estrela C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CR, Bammann LL (1999) Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. *Brazilian Dental Journal* **10**, 63-72.
- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian Dental Journal* **6**, 85-90.
- Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, Prati C, Dummer PM (2013) 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *International Endodontic Journal* **46**, 253-63.
- Guerreiro JCM, Ochoa-Rodríguez VM, Rodrigues EM *et al.* (2021) Antibacterial activity, cytocompatibility and effect of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament on osteoblast biology. *International Endodontic Journal* **54**, 1155-65.
- Holland R, Gomes-Filho JE, Cintra LTA, Queiroz ÍOA, Estrela C (2017) Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *Journal Applied Oral Science* **25**, 465-76.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 6876: root canal sealing materials. Geneva; 2012.
- Kahler SL, Shetty S, Andreasen FM, Kahler B (2018) The effect of long-term dressing with calcium hydroxide on the fracture susceptibility of teeth. *Journal of Endodontics* **44**, 464-9.
- Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo Rde T, Utrilla LS, Assed S (1993) Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical

lesions. *Journal of Endodontics* **19**, 348-52.

Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M (2012) Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* **45**, 311-6.

Lopes CS, Delfino MM, Tanomaru-Filho, Sasso-Cerri, Guerreiro-Tanomaru, Cerri PS (2022) Hepatic enzymes and immune inflammatory response to Bio-C Temp bioceramic intracanal medication implanted into the subcutaneous tissue of rats. *Scientific Reports* **12**, 2788.

Mohammadi Z, Dummer PMH (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal* **44**, 697-730.

Moraes TG, Menezes AS, Grazziotin-Soares R, et al (2022) Impact of immersion media on physical properties and bioactivity of epoxy resin-based and bioceramic endodontic sealers. *Polymers (Basel)* **14**, 729.

Mustafa R, Alshali RZ, Silikas N (2018) The effect of desiccation on water sorption, solubility and hygroscopic volumetric expansion of dentine replacement materials. *Dental Materials* **34**, e205-13.

Oliveira LV, da Silva GR, Souza GL *et al.* (2020) A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. *International Endodontic Journal* **53**, 1140-52.

Oliveira LV, de Souza GL, da Silva GR *et al.* (2021) Biological parameters, discolouration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. *International Endodontic Journal* **54**, 2133-2144.

Pereira TC, da Silva Munhoz Vasconcelos LR, Graeff MSZ, Ribeiro MCM, Duarte MAH *et al.* (2019) Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clinical Oral Investigation* **23**, 1253-62.

Pivoto-João MMB, Tanomaru-Filho M, Pinto JC, Espir CG, Guerreiro-Tanomaru JM (2020) Root canal preparation and enlargement using thermally treated nickel-titanium rotary systems in curved canals. *Journal of Endodontics* **46**, 1758-65

Prati C, Gandolfi MG (2015) Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dental Materials* **31**, 351-70.

- Ricucci D, Siqueira JF Jr (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics* **36**, 1277-88.
- Santos-Junior AO, Tanomaru-Filho M, Pinto JC, Tavares KIMC, Pivoto-João MMB, Guerreiro-Tanomaru JM (2020) New Ultrasonic Tip Decreases Uninstrumented Surface and Debris in Flattened Canals: A Micro-computed Tomographic Study. *Journal of Endodontics* **46**, 1712-8.
- Segato RA, Pucinelli CM, Ferreira DC et al (2016) Physicochemical Properties of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth. *Brazilian Dental Journal* **27**,196-201.
- Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM (2021) Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an *in vivo* study in rats. *International Endodontic Journal* **54**, 100-11.
- Silva EJ, Perez R, Valentim RM, et al (2017) Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: a micro-CT approach. *International Endodontic Journal* **50**; 407-14.
- Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA (2003) Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *International Endodontic Journal* **36**, 733-9.
- Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Bosso-Martelo R, Chávez-Andrade GM, Bonetti-Filho I, Guerreiro-Tanomaru JM (2017) A novel model for evaluating the flow of endodontic materials using micro-computed tomography. *Journal of Endodontics* **43**, 796-800.
- Tavares KIMC, Pinto JC, Santos-Junior AO, Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2021) Micro-CT evaluation of filling of flattened root canals using a new premixed ready-to-use calcium silicate sealer by single-cone technique. *Microscopy Research & Technique* **84**, 976-81.
- Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chavez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M (2019) Effect of immersion in distilled water or phosphate buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **53**, 385-91.

- Verma R, Fischer BI, Gregory RL, Yassen GH. The radiopacity and antimicrobial properties of different radiopaque double antibiotic pastes used in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics* **44**, 1376-80.
- Versani MA, Abi Rached-Junior FJ, Kishen A, et al. (2016) Zinc oxide nanoparticles enhance physicochemical characteristics of Grossman sealer. *Journal of Endodontics* **42**, 1804–10.
- Vertuan GC, Duarte MAH, Moraes IG et al. (2018) Evaluation of physicochemical Properties of a new root canal sealer. *Journal of Endodontic* **44**, 501-5.
- Villa N, Santos VVD, Costa UMD et al. A New Calcium Silicate-Based Root Canal Dressing: Physical and Chemical Properties, Cytotoxicity and Dentinal Tubule Penetration. *Brazilian Dental Journal* **31**, 598-604.
- Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR et al. (2016) Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *Journal of Endodontic* **42**, 1822-8.
- Zare Jahromi M, Kalantar Motamedi MR (2019) Effect of calcium hydroxide on inflammatory root resorption and ankylosis in replanted teeth compared with other intracanal materials: a review. *Restorative Dentistry & Endodontics* **44**, e32.
- Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM (2021) Physicochemical properties, cytocompatibility and antibiofilm activity of a new calcium silicate sealer. *Brazilian Dental Journal*. **32**, 8-18.

4 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que a resposta inflamatória promovida pelo Calen e Bio-C Temp foi significativamente maior aos 7 dias após os implantes no tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos. Este achado também foi observado no grupo controle do presente estudo, como em demais estudos³⁸⁻⁴⁴, sugerindo que o trauma cirúrgico deve causar uma inflamação na área de inserção do tubo³⁸.

A pasta Calen é um medicamento à base de hidróxido de cálcio associada ao veículo polietilenoglicol 400, óxido de zinco como radiopacificador e colofônia. Esta medicação proporciona um pH em torno 12,5²³. No presente estudo, o pH da solução onde a pasta Calen ficou imersa variou de 11,04 a 11,49, permanecendo praticamente inalterado até os 28 dias. Os materiais à base de silicato de cálcio fornecem pH em torno de 11 às soluções após 3 a 7 dias de imersão^{60,76}. No presente estudo, o Bio-C Temp forneceu maiores valores de pH na primeiras 24 horas de imersão em água destilada. Portanto, o pH alcalino pode ser responsável pelo maior recrutamento de células inflamatórias observado inicialmente nas cápsulas em resposta aos implantes do Bio-C Temp.

O meio alcalino estimula o recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos^{42,76}, bem como a diferenciação de plasmócitos⁶¹. A liberação de cálcio induz a produção e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 e IL-6. Estas citocinas potencializam a ação dos neutrófilos, promovem a ativação da produção de prostaglandinas e a produção de enzimas proteolíticas^{77,78}. Dessa maneira, o pH alcalino e a liberação de cálcio induzem uma resposta inflamatória.

Diante disso, a alcalinidade do hidróxido de cálcio induz a formação de uma zona de necrose de coagulação⁷⁹, na superfície do tecido em contato com o material^{8,80,81}. Áreas necróticas também induzem o recrutamento de células inflamatórias para este local⁷⁹, como a migração de neutrófilos⁸¹. Esta característica foi verificada no presente estudo como também em outros estudos^{42,80,81}.

Diversos estudos conduzidos com implantes nos tecidos do subcutâneo de ratos também demonstraram que o Calen^{26,80} bem como pasta de hidróxido de cálcio⁸¹ provocam uma maior resposta inflamatória aos 7 dias. Porém essa resposta diminui ao longo do tempo, particularmente de 7 para 30 dias^{26,80,81} e de 7 para 60 dias⁸² após a implatação, corroborando com os resultados do presente estudo.

Assim, a reação inflamatória intensa inicialmente observada deve ser em decorrência do pH alcalino apresentado pelas pastas à base de hidróxido de cálcio^{26,80,81}.

Estudos *in vivo* avaliando a resposta tecidual do Bio-C Temp não foram encontrados na literatura, até o momento. Entretanto, estudos sobre a biocompatibilidade de materiais à base de silicato de cálcio, em subcutâneo, observaram maior número de células inflamatórias aos 7 dias após ao implante no subcutâneo regredindo aos 60 dias^{38,40,60,61,76}. Resultado semelhante foi observado no em Bio-C Temp, em que, houve um decréscimo da intensidade da reação inflamatória no decorrer dos períodos.

Tem sido conferido ao silicato de cálcio, presente na composição do Bio-C Temp, a responsabilidade pela biocompatibilidade de materiais de silicato tricálcico^{40,60,76}. Após 60 dias ao implante, as cápsulas adjacentes ao Bio-C Temp continham diversos fibroblastos e feixes de fibras colágenas em íntimo contato com as partículas do material, apontando para uma reorganização do tecido. Portanto, no decorrer do tempo o efeito irritante promovido pelo material diminuiu, de maneira a possibilitar a proliferação de fibroblastos e a formação de fibras colágenas, elementos fundamentais para a reparação do tecido conjuntivo^{39,49,83}.

A análise quantitativa do conteúdo birrefringente mostrou um aumento significativo no conteúdo de colágeno nas cápsulas ao redor do Bio-C Temp e nos implantes do grupo controle aos 60 dias. Este aumento significativo de colágeno foi acompanhado pela redução significativa de células inflamatórias apontando para a biocompatibilidade do Bio-C Temp. Em subcutâneo de ratos, materiais à base de silicato de cálcio^{40,60,83} também apresentaram reação inflamatória moderada inicial que regrediu e foi substituída por um tecido conjuntivo rico em colágeno com o decorrer do tempo, indicando a biocompatibilidade do material.

A pasta Calen apresentou menor quantidade de colágeno e maior número de células inflamatórias, mesmo após 60 dias, em comparação a nova pasta biocerâmica, Bio-C Temp. Além disso, áreas de necrose ainda foram observadas aos 60 dias nas amostras do Calen. É possível que este achado seja devido ao maior pH (maior alcalinização) que a pasta Calen pode proporcionar ao microambiente, desde que a solução contendo o Calen apresentou um pH significativamente maior em comparação à solução do Bio-C Temp. No entanto, a persistência de áreas de necrose aos 60 dias também pode ser justificado, pelo

menos em parte, devido a presença de íons zinco provenientes do agente radiopacificador óxido de zinco na pasta Calen, uma vez que, íons de zinco causam uma atividade deletéria secundária⁸⁴, levando a um quadro de inflamação crônica. Embora o hidróxido de cálcio seja um material classificado como biocompatível^{25,79}, as substâncias adicionadas a ele, no sentido de melhorar suas propriedades antimicrobianas e físico-químicas podem provocar injúrias teciduais, alterando as suas propriedades biológicas⁸⁵.

Concomitantemente ao aumento de partículas dispersas pelo tecido, foi observado o aumento da espessura das cápsulas adjacentes aos materiais implantados no subcutâneo dos animais, principalmente nas cápsulas do Bio-C Temp. É possível que a presença de partículas se deva ao fato das medicações não tomarem presença, uma vez que, devem ser removidas previamente ao uso do material obturador ou reparador⁶. De acordo com o fabricante, o veículo resina base presente no Bio-C Temp tem o intuito de evitar a presa da medicação na presença de umidade, além de facilitar a sua inserção no interior do canal radicular⁸⁶. Além disso, através de análise em micro-CT utilizando dentes humanos extraídos, realizado no presente trabalho, observou que a medicação biocerâmica apresentou melhor capacidade de preencher os canais radiculares.

Desde que a elevada imunoexpressão de IL-6 pode estar envolvida na manutenção da reação inflamatória^{39,41}, a acentuada presença desta interleucina está associada à degradação dos componentes da matriz extracelular, como fibras de colágeno. Há evidências de que há uma forte correlação positiva entre IL-6 e metaloproteinases de matriz (MMP), como MMP-1 e MMP-9, enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular⁸⁷. Também é possível sugerir que a IL-6 pode exercer um controle sobre a degradação dos componentes da matriz extracelular, uma vez que os valores mais altos desta interleucina foram paralelos ao menor conteúdo de colágeno nas amostras de Calen, enquanto que menor imunoexpressão de IL-6 foi concomitante com a quantidade acentuada de colágeno nas cápsulas do grupo controle. Adicionalmente, a redução da imunoexpressão de IL-6 foi paralela ao aumento da imunomarcagem de IL-10 ao longo do tempo. A IL-10 é produzida por várias células, incluindo macrófagos, células T, células B e mastócitos⁸⁸. A IL-10 é uma citocina imunomoduladora que possui efeitos anti-inflamatórios potentes e exerce controle na resposta imune^{88,89}. De modo geral, o aumento da IL-10 está correlacionado com a diminuição da reação inflamatória^{90,91},

conforme observado no presente estudo. Foi sugerido que a IL-10 inibe o fator nuclear-kappa B (NF- κ B), resultando na redução de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral α ⁹².

No presente estudo, vários mastócitos exibiram uma marcação acentuada para IL-10. Embora mastócitos imunopositivos para IL-10 tenham sido observados em todos os períodos, a presença marcante de mastócitos imunomarcados aos 60 dias pode estar associada à alta formação de colágeno, sugerindo reparo tecidual. Uma das ações anti-inflamatórias da IL-10 é a capacidade de modular a produção de citocinas inflamatórias pelos mastócitos. Os mastócitos contêm receptores de IL-10 e, via IL-10, liberam vários mediadores inflamatórios, que medeiam as respostas imunitárias e inflamatórias⁹³ e participam da remodelação e reparação tecidual^{83,93}. O número acentuado de mastócitos nas cápsulas ao redor de um biomaterial reparativo à base de silicato de cálcio, o Biodentine, foi associado à proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, à formação de colágeno, sustentando o conceito de que esta célula está envolvida no reparo do tecido conjuntivo⁸³. Além disso, há evidências de que a IL-10 deve inibir a produção de IL-6 pelos mastócitos em resposta à inflamação e infecção bacteriana⁹⁴. Assim, nossos achados indicam que o aumento da IL-10 pode inibir a imunoexpressão da IL-6 nas cápsulas, atenuando a reação inflamatória promovida pelos medicamentos intracanal Bio-C Temp e Calen implantados no tecido conjuntivo do subcutâneo.

Apesar da diferença de alcalinidade das pastas estudadas, ambas apresentaram o pH alcalino, a alcalinidade do meio favorece o reparo e a calcificação ativa⁸ ativando enzimas teciduais, como a ALP, que propicia a mineralização^{7,9}. A ALP é o marcador mais comumente usado para o metabolismo ósseo, refletindo a extensão da formação óssea e a atividade dos osteoblastos⁹⁵. Considerando que um material bioativo deve possuir a característica de promover a reparação do tecido e a formação de estruturas mineralizadas⁹⁶, nossos resultados indicam que o Bio-C Temp e a pasta Calen apresentam potencial bioativo.

No presente estudo foi realizada a punção cardíaca para avaliar se os materiais Bio-C Temp e Calen aumentariam os níveis séricos de cálcio, fósforo e ALP. Não foram encontrados estudos que tenham avaliado os efeitos nos parâmetros bioquímicos destes materiais. O cálcio e o fósforo são reguladores da mineralização óssea⁹⁷. Em todos os períodos, o nível de cálcio nas amostras do Bio-C Temp e Calen foram semelhantes ao grupo controle. Portanto, estes resultados

sugerem que os íons cálcio liberados por estes materiais implantados no subcutâneo não entraram na circulação sistêmica. A análise da concentração plasmática de fósforo e ALP entre os grupos evidenciou diferença significativa aos 7 dias com maior concentração nas amostras do Calen. Sabe-se que o pH alcalino do hidróxido de cálcio ativa a ALP estimulando a liberação dos íons fosfato, a partir dos ésteres de fosfato do organismo, que ao reagirem com os íons cálcio, se precipitam na forma de hidroxiapatita⁸. Nas amostras do Bio-C Temp maiores níveis de APL foram observados no período de 15 dias; é possível que este maior valor na ALP possa estar correlacionado com o aumento de partículas liberadas por esse material.

A neoformação de constituintes da matriz dos tecidos mineralizados pode ser avaliada por imuno-histoquímica para detectar as diversas proteínas existentes, dentre elas a OCN⁶⁵. Estudos relataram que materiais contendo silicato de cálcio induziram a imunoexpressão de OCN^{38,5366,67} nas células do tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos. O mesmo foi observado no presente estudo, no entanto, diferenças significantes não foram observadas no número de células imunopositivas para OCN nas cápsulas formadas em respostas às medicações Bio-C Temp e Calen. Desde que no grupo controle não foi detectada imunoreatividade à OCN, nossos achados indicam que ambas as medicações induziram as células do tecido conjuntivo do subcutâneo a expressarem fenótipo de células semelhantes às células formadoras de tecidos mineralizados.

A imunomarcagem para OCN aumentou a partir dos 30 dias, este achado é explicado pelo fato da OCN ser uma proteína considerada um marcador osteogênico tardio⁹⁸. Além disso, de 30 para 60 dias, verificou-se a diminuição do processo inflamatório *comitantemente* a formação gradativa de colágeno e, portanto, indícios de reparação. Outros trabalhos observaram que o aumento da expressão da OCN acompanhou a diminuição da inflamação em subcutâneo de ratos em resposta a outros materiais endodônticos^{43,66}. O aumento da expressão de OCN foi também associado a reparação de tecido conjuntivo pulpar após o clareamento dental em molares superiores de ratos⁹⁹.

Adicionalmente, usando a técnica histoquímica de von Kossa também foi possível observar o potencial bioativo das medicações. Nas amostras do Bio-C Temp e Calen, estruturas positivas ao von Kossa foram observadas nas cápsulas em todos os períodos, indicando, portanto, a presença de cálcio/fosfato nas cápsulas. Estudos reportaram que materiais à base de silicato de cálcio induzem a

precipitação de cálcio nas cápsulas formadas adjacentes aos implantes no subcutâneo de ratos, evidenciado por esse método^{38,41,43}. Para identificar depósitos amorfos de calcita, foi realizada a análise dos cortes não corados com luz polarizada, no qual, foi possível observar nas cápsulas do Bio-C Temp e Calen, em todos os períodos, estruturas irregulares e birrefringentes. Estas estruturas birrefringentes observadas nas cápsulas formadas em resposta à implantes são consideradas como depósitos amorfos de calcita^{41,100}, sugerido que estes materiais podem apresentar potencial bioativo. Esta ideia é reforçada desde que estruturas von Kossa-positivas bem como birrefringentes não foram observadas nas cápsulas do grupo controle.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a medicação biocerâmica Bio-C Temp apresenta biocompatibilidade e potencial bioativo, desde que os danos teciduais, inicialmente provocados pela pasta biocerâmica, foram suprimidos mais rapidamente em comparação àqueles provocados pelo Calen, favorecendo a reparação do tecido conjuntivo. O reparo tecidual mais rápido do Bio-C Temp pode ser atribuído a menor alcalinidade do Bio-C Temp, no qual, também foi associada a menor solubilidade e alteração volumétrica verificada nesta medicação. O menor valor de pH apresentando pelo Bio-C Temp pode ser explicado pela dissociação de íons hidroxila e cálcio⁹. Materiais a base de silicato de cálcio, como o Bio-C Temp, somente após a reação de hidratação formam hidróxido de cálcio e que se dissociam íons hidroxila e cálcio²¹. Além disso, um menor número de moléculas de hidróxido de cálcio é formado após a reação de hidratação em comparação com a quantidade de moléculas já presentes nas medicações à base de hidróxido de cálcio²⁷.

A pasta Calen apresentou maior solubilidade e alteração volumétrica em comparação ao Bio-C Temp. Há evidência sugerindo que materiais com maior solubilidade e perda volumétrica apresentam maior valor de pH, decorrente da dissociação de íons cálcio e hidroxila⁴⁵. Dessa maneira, os nossos resultados corroboram com este conceito desde que a pasta Calen mostrou maior pH e solubilidade. A pasta Calen apresenta na sua composição o veículo viscoso polietilenoglicol, que permite a liberação de íons cálcio e hidroxila de forma lenta e por períodos mais longos do que os materiais com veículo aquoso²⁴, no qual, o maior nível de liberação de íons cálcio ocorre aos 30 e 60 dias¹⁹.

Um maior escoamento pode ser associado a uma melhor capacidade de preenchimento do canal radicular¹⁰¹. No entanto, no presente estudo a pasta Calen foi a medicação que apresentou maior escoamento e menor capacidade de preenchimento. O que pode ser justificado pelas diferentes metodologias, uma vez que o teste de escoamento foi baseado nas normas International Standard Organization (ISO) 6876¹⁰² e a capacidade de preenchimento por análise em micro-CT. O escoamento pelos testes convencionais não apresenta correlação com a capacidade de preenchimento, o modelo por meio de imagens de micro-CT mostra resultados adequados e reprodutíveis⁷¹. Contudo, tanto o Calen como o Bio-C Temp apresentaram escoamento superior ao valor mínimo recomendado pela ISO 6876. No entanto, um alto escoamento pode causar extravasamento do material para os tecidos periapicais²¹.

As medicações intracanal devem ser radiopocadas, para melhor observação do preenchimento do sistema de canais radiculares em exames por imagens, permitindo o acompanhamento clínico do tratamento²¹. É importante que o material apresente uma radiopacidade superior a dentina, permitindo a análise do preenchimento do canal; no entanto, as pastas à base de hidróxido de cálcio apresentam baixa radiopacidade³¹. O mesmo foi observado no presente estudo no qual a pasta Calen apresentou menor radiopacidade em comparação ao Bio-C Temp. As duas medicações endodônticas apresentaram valor de radiopacidade inferior a 3 mm Al, valor mínimo recomendado pela ISO 6876. Um estudo reportou radiopacidade superior a 3 mm Al em um material biocerâmico associado ao tungstato de cálcio¹⁰³. Entretanto, essa característica se deve a porcetagem deste composto presente no material, informação essa não fornecida pelo fabricante da pasta Bio-C Temp.

No presente estudo, a medicação biocerâmica mostrou ser o material biocompatível e bioativo. Portanto, espera-se que o Bio-C Temp, quando em contato com os tecidos periapicais, possa induzir a reparação tecidual e óssea. Além disso, a pasta biocerâmica mostrou propriedades físico-químicas adequadas, melhor capacidade de preenchimento, radiopacidade, menor solubilidade e alteração volumétrica, o que possibilita que o material permaneça por maior tempo no interior do canal radicular eliminando a necessidade de novas aplicações do hidróxido de cálcio, que exige trocas frequentes. Em contraposição, o uso de medicação

intracanal por longos períodos de tempo pode ter um impacto negativo na resistência à fratura de dentes¹⁰⁴.

No entanto, a pasta Calen foi a medicação que proporcionou maior alcalinidade ao meio; o valor da alcalinidade parece ter uma correlação diretamente proporcional a atividade antimicrobiana das medicações intracanal²⁷. O cálcio tem função na remoção de gás carbônico que constitui fonte respiratória de bactérias anaeróbias¹⁸. Há evidências, *in vitro*¹⁰⁵ e *in vivo*¹⁰⁶, de que pastas que proporcionam pH alcalino apresentam efetividade na hidrólise da endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo), que constitui em um componente agressor presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, sendo que o pH 11 só retarda seu crescimento, sendo necessário valores a partir de 11,5 para sua eliminação¹⁰⁷. Portanto, mais estudos são necessários para confirmar a segurança e viabilidade dessa nova medicação biocerâmica na prática clínica.

5 CONCLUSÃO

O Bio-C Temp é biocompatível, permite a reparação do tecido conjuntivo e não deve induzir alterações hepáticas, desde que não causou alterações nos níveis das enzimas TGP e TGO.

O Bio-C Temp é uma medicação com potencial bioativo e, portanto, espera-se que quando a pasta biocerâmica entre em contato com os tecidos periapicais possa induzir a reparação óssea.

O Bio-C Temp apresentou propriedades físico-químicas adequadas, como melhor capacidade de preenchimento, radiopacidade, menor solubilidade e alteração volumétrica, no entanto, promoveu menor alcalinidade do meio, uma propriedade importante para uma maior ação antimicrobiana.

REFERÊNCIAS*

1. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36(8): 1277-88.
2. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B et al. One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012; 38(8): 1040-52.
3. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6): 348-81.
4. Holland R, Gomes-Filho JE, Cintra LTA, Queiroz ÍOA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *J Appl Oral Sci.* 2017; 25(5): 465-76.
5. Murad C, Fariniuk LF, Fidel S, Fidel RA, Sassone LM. Bacterial leakage in root canals filled with calcium hydroxide paste associated with different vehicles. *Braz Dent J.* 2008; 19(3): 232-7.
6. Alsubait S, Alsaad N, Alahmari S, Alfaraj F, Alfawaz H, Alqedairi A. The effect of intracanal medicaments used in Endodontics on the dislocation resistance of two calcium silicate-based filling materials. *BMC Oral Health.* 2020; 20(1): 57.
7. Estrela C, Decurcio DA, Rossi-Fedele G, Silva JA, Guedes OA, Borges ÁH. Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials. *Braz Oral Res.* 2018; 32(suppl 1): e73.
8. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6(2): 85-90.
9. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011; 44(8): 697-730.
10. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36(11): 733-9.
11. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988; 14(3): 125-7.
12. Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W. Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod.* 2006; 32(12): 1142-5.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J*. 2008; 41(11): 933-8.
14. Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(5): 680-5.
15. Andreasen J, Christensen S. Relationship between calcium hydroxide pH levels in the root canals and periodontal healing after replantation of avulsed teeth. *Endod Topics*. 2006; 14: 93-101.
16. Tanomaru-Filho M, Sacaki JN, Faleiros FB, Guerreiro-Tanomaru JM. pH and calcium ion release evaluation of pure and calcium hydroxide-containing Epiphany for use in retrograde filling. *J Appl Oral Sci*. 2011; 19(1): 1-5.
17. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumatol*. 2007; 23(1): 21-5.
18. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J*. 1995; 28(6): 285-9.
19. Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo Rde T, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod*. 1993; 19(7): 348-52.
20. de Andrade Ferreira FB, Silva ESPA, do Vale MS et al. Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(3): 388–92.
21. Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, Duarte MA. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *J Endod*. 2016; 42(12): 1822-8.
22. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*. 1999; 32(4): 257–82.
23. Leonardo MR, Reis RT, Silva LAB, Loffredo LCM. Hidróxido de cálcio em Endodontia: avaliação da alteração do pH e da liberação de íons cálcio em produtos endodônticos à base de hidróxido de cálcio. *RGO*. 1992; 40(1): 69-72.
24. Ballal NV, Shavi GV, Kumar R, Kundabala M, Bhat KS. In vitro sustained release of calcium ions and pH maintenance from different vehicles containing calcium hydroxide. *J Endod*. 2010; 36(5): 862-6.

25. Nelson-Filho P, Silva LA, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J*. 1999; 32(4): 303-11.
26. Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G et al. Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *ISRN Dent*. 2012; 2012: 904963
27. Guerreiro 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.
28. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*. 2002; 35(9): 735-9.
29. Kahler SL, Shetty S, Andreasen FM, Kahler B. The effect of long-term dressing with calcium hydroxide on the fracture susceptibility of teeth. *J Endod*. 2018; 44(3): 464-9.
30. Dudeja C, Taneja S, Kumari M, Singh N. An *in vitro* comparison of effect on fracture strength, pH and calcium ion diffusion from various biomimetic materials when used for repair of simulated root resorption defects. *J Conserv Dent*. 2015; 18(4): 279-83.
31. Segato RA, Pucinelli CM, Ferreira DC, Daldegan Ade R, Silva RS, Nelson-Filho P et al. Physicochemical Properties of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth. *Braz Dent J*. 2016 ; 27(2): 196-201.
32. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002; 35(3): 221-8.
33. Lima LK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, 2012; 45(4): 311-6.
34. Javidi M, Afkhami F, Zarei M, Ghazvini K, Rajabi O. Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root canal medication on elimination of *Enterococcus faecalis*. *Aust Endod J*. 2014; 40(2): 61-5.
35. Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M. Antimicrobial Activity and pH of Calcium Hydroxide and Zinc Oxide Nanoparticles Intracanal Medication and Association with Chlorhexidine. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(8): 624-9.
36. Zare Jahromi M, Kalantar Motamedi MR. Effect of calcium hydroxide on inflammatory root resorption and ankylosis in replanted teeth compared with other intracanal materials: a review. *Restor Dent Endod*. 2019; 44(3): e32.

37. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015; 31(4): 351-70.
38. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater ResB Appl Biomater.* 2012; 100(7): 1773-81.
39. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* 2016; 49(2): 145-53.
40. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, da Fonseca TS, Bernardi MIB, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M et al. Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. *Int Endod J.* 2017; 50(Suppl 2): e95-e108.
41. Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 7173.
42. Hoshino RA, Delfino MM, da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E et al. Biocompatibility and bioactive potential of the NeoMTA Plus endodontic bioceramic-based sealer. *Restor Dent Endod.* 2020; 46(1): e4.
43. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an in vivo study in rats. *Int Endod J.* 2021; 54(1): 100-11.
44. Delfino MM, de Abreu Jampani JL, Lopes CS, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E et al. Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with White MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *Int Endod J.* 2021; 54(9): 1597-613.
45. Zordan-Bronzel CL, Mario-Tanomaru M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potencial and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J.* 2019; 52(7): 979-86.
46. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM. Physicochemical Properties, Cytocompatibility and Antibiofilm Activity of a New Calcium Silicate Sealer. *Braz Dent J.* 2021; 32(4): 8-18.
47. Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater.* 2021; 37(2): 311-20.

48. Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a calcium silicate-based endodontic cement (BioRoot RCS): Interactions with human periodontal ligament cells *in vitro*. J Endod. 2015; 41(9): 1469-73.
49. Duarte MAH, Marciano MA, Vivian RR, Tanomaru Filho M, Tanomaru JMG, Camilleri J. Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. Braz Oral Res. 2018; 32(suppl 1):e70.
50. Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. J Endod. 2012; 38(6): 842-5.
51. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: Biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. J Appl Biomater Funct Mater. 2015;13(1):1–18.
52. Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. J Investig Clin Dent. 2017; 8(2): e12195.
53. Villa N, dos Santos VV, da Costa UM, Mendes AT, Duarte PHM, da Rosa RA et al. A new calcium silicate-based root canal dressing: physical and chemical properties, cytotoxicity and dentinal tubule penetration. Braz Dent J. 2020; 31(6): 598-604.
54. Bio-C® Temp [bula]. Londrina: Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A; 2022 [acesso em 2022 mar. 30]. Disponível em: <http://www.angelusdental.com/products/details/id/214>.
55. Oliveira LV, da Silva GR, Souza GL, Magalhães TEA, Barbosa GLR, Turrioni AP et al. A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. Int Endod J. 2020; 53(8): 1140-52.
56. Oliveira LV, de Souza GL, da Silva GR, Magalhães TEA, Freitas GAN, Turrioni AP et al. Biological parameters, discolouration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. Int Endod J. 2021; 54(11): 2133-44.
57. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. J Dent. 2009; 37(1): 76–8.
58. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices. Part 6: tests for local effects after implantation. Geneve: ISO; 2016.
59. Lalis RM, Esaín ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat subcutaneous tissue response to modified portland cement, a new mineral trioxide aggregate. Braz Dent J. 2009; 20(2): 112-7.

60. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(12): 4336-45.
61. Saraiva JA, da Fonseca TS, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater*. 2018; 13(3): 035002.
62. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukine-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1994; 153:811–6.
63. Huang TH, Ding SJ, Hsu TC, Kao CT. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials*. 2003; 24(22): 3909-13.
64. Lopes CS, Delfino MM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Hepatic enzymes and immunoinflammatory response to Bio-C Temp bioceramic intracanal medication implanted into the subcutaneous tissue of rats. *Sci Rep*. 2022; 12(1): 2788.
65. Penteado R, Romito GA, Pustiglioni FE, Marques MM. Morphological and proliferative analysis of the healing tissue in human alveolar sockets covered or not by an e-PTFE Membrane: a preliminar immunohistochemical and ultrastructural study. *Braz J Oral Sci*. 2005; 4(12): 664-9.
66. de Azevedo Queiroz IO, Mello WG, Martins CM, Dal Fabbro R, Narciso LG, Massunari L et al. Expressão sistêmica de marcadores ósseos induzida por agregado de trióxido mineral cinza e branco em condições normais e diabéticas. *Int Endod J*. 2018; 51 (8): 889-900.
67. Cosme-Silva L, Gomes-Filho JE, Benetti F, Dal-Fabbro R, Sakai VT, Cintra LTA et al. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. *Int Endod J*. 2019; 52(5): 689-700.
68. Mahmud Z, Bachar S, Qais N. Antioxidant and hepatoprotective activities of ethanolic extracts of leaves of *prema esculenta* roxb. Against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *J Young Pharm*. 2012; (4): 228-34
69. Solak H, Oztan MD. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *J Oral Rehabil*. 2003; 30(4): 436-9.
70. Celikten B, Jacobs R, de Faria Vasconcelos K, Huang Y, Shaheen E, Nicolielo LF et al. Comparative evaluation of cone beam CT and micro-CT on blooming artifacts in human teeth filled with bioceramic sealers. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(8): 3267–73.

71. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Bosso-Martelo R, Chávez-Andrade GM, Bonetti-Filho I, Guerreiro-Tanomaru JM. A Novel Model for Evaluating the Flow of Endodontic Materials Using Micro-computed Tomography. *J Endod*. 2017; 43(5): 796-800.
72. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, Prati C, Dummer PM. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J*. 2013; 46(3): 253-63.
73. de Lucena JM, Decker EM, Walter C, Boeira LS, Löst C, Weiger R. Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: chlorhexidine versus octenidine. *Int Endod J*. 2013; 46(1): 53-6.
74. López-García S, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C, et al. Comparative Cytocompatibility and Mineralization Potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials (Basel)*. 2019; 12(19).
75. Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 3933.
76. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(8): 2015-25.
77. Sitaru A, Hantoiu T, Monea M. Tissue reactions induced by dental pulp capping materials. *Europ Sci J*. 2014; 10(9):95-104.
78. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MAH, Grizzo LT, Buzalaf MAR, et al. pH, calcium ion release and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *J Endod*. 2011; 37(6):844-6.
79. Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol*. 1971;4:83-95.
80. Midená RZ, Garcia RB, Cavenago BC, Marciano MA, Minotti PG, Ordinola-Zapata R, et al. Analysis of the reaction of subcutaneous tissues in rats and the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste used in association with different substances. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(5):508-14.
81. Silva GF, Cesário F, Garcia AMR, Weckwerth PH, Duarte MAH, de Oliveira RC, Vivan RR. Effect of association of non-steroidal anti-inflammatory and antibiotic agents with calcium hydroxide pastes on their cytotoxicity and biocompatibility. *Clin Oral Investig*. 2020;24(2):757-63.
82. Lima CC, Conde Júnior AM, Rizzo MS, Moura RD, Moura MS, Lima MD et al. Biocompatibility of root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J*. 2015; 48(5): 405-16.

83. da Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Mast cells and immunoexpression of FGF-1 and Ki-67 in rat subcutaneous tissue following the implantation of Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J*. 2019; 52(1):54-67.
84. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod*. 1995; 21(3):122-7.
85. Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LA, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J*. 2009; 20(2):99-106.
86. Cosme-Silva L, Gomes-Filho JE, Benetti F, Dal-Fabbro R, Sakai VT, Cintra LTA, et al. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. *Int Endod J*. 2019;52(5):689-700.
87. de Oliveira PA, de Pizzol-Júnior JP, Longhini R, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces interleukin-6, matrix metalloproteinases-1 and -9 immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontal disease. *J Periodontol*. 2017;88(1):100-11.
88. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683-765.
89. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012; 32(1): 23-63.
90. Bambirra W Jr, Maciel KF, Thebit MM, de Brito LC, Vieira LQ, Sobrinho AP. Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection. *J Endod*. 2015; 41(7): 1085-90.
91. Cavenago BC, Del Carpio-Perochena AE, Ordinola-Zapata R, Estrela C, Garlet GP, Tanomaru-Filho M et al. Effect of Using Different Vehicles on the Physicochemical, Antimicrobial, and Biological Properties of White Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2017; 43(5): 779-86.
92. Martinho FC, Leite FRM, Chiesa WMM, Nascimento GG, Feres M, Gomes BPFA. Signaling Pathways Activation by Primary Endodontic Infectious Contents and Production of Inflammatory Mediators. *J Endod*. 2014; 40(4): 484-9.
93. Blank U, Madera-Salcedo IK, Danelli L. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol*. 2014; 5: 453.
94. Marshall JS, Leal-Berumen I, Nielsen L, Glibetic M, Jordana M. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1122-8.

95. Montazeri-Najafabady N, Ghasemi Y, Dabbaghmanesh MH, Talezadeh P, Koohpeyma F, Gholami A. Supportive Role of Probiotic Strains in Protecting Rats from Ovariectomy-Induced Cortical Bone Loss. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019; 11(4): 1145-54.
96. Niu LN, Jiao K, Wang TD, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *J Dent*. 2014; 42(5): 517-33.
97. Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Açıl Y, Glüer CC, Schrezenmeir J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr*. 2007; 137(3 Suppl 2): 838S-46S.
98. Blanquer A, Musilkova J, Barrios L, Ibáñez E, Vandrovcova M, Pellicer E et al. Cytocompatibility assessment of Ti-Zr-Pd-Si-(Nb) alloys with low Young's modulus, increased hardness, and enhanced osteoblast differentiation for biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018; 106(2): 834-42.
99. Benetti F, Briso ALF, Carminatti M, de Araújo Lopes JM, Barbosa JG, Ervolino E et al. The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. *Int Endod J*. 2019; 52(5): 665-75.
100. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999; 25(3): 161-6.
101. Esberard RM, Carnes DL Jr, Del Rio CE. Changes in pH at the dentin surface in roots obturated with calcium hydroxide pastes. *J Endod*. 1996; 22: 402-5.
102. International Organization for Standardization (ISO). ISO 6876: root canal sealing materials. Geneva; 2012.
103. Ochoa-Rodríguez VM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Faria G. Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. *J Appl Oral Sci*. 2019; 1(27):e20180429.
104. Hawkins JJ, Torabinejad M, Li Y, Retamozo B. Effect of three calcium hydroxide formulations on fracture resistance of dentin over time. *Dent Traumatol*. 2015; 31(5): 380-4.
105. Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 104(1): 135-42.
106. Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod*. 2002; 28(2): 94-8.

107. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod. 2004; 30(4) :218-9.

APÊNDICE A - METODOLOGIA DAS PUBLICAÇÕES 1 e 2

ANIMAIS

O protocolo da presente pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAr/UNESP (Processo nº 22/2018 – ANEXO A).

Foram utilizados 60 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, com peso entre 270 e 300 gramas. Os animais foram mantidos em temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) controladas, fotoperíodo de 12 horas e receberam ração granulada (Nutrilabor; Guabi, Campinas, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos equitativamente em três grupos ($n=20/\text{grupo}$), de acordo com os materiais implantados no subcutâneo: GBIO (Grupo BIO-C TEMP, Angelus, Londrina, Brasil); GCAL (Grupo Calen, SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brasil) e GC (Grupo Controle – tubo de polietileno vazio). Os dados e procedência dos materiais estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1- Medicações intracanal e suas composições

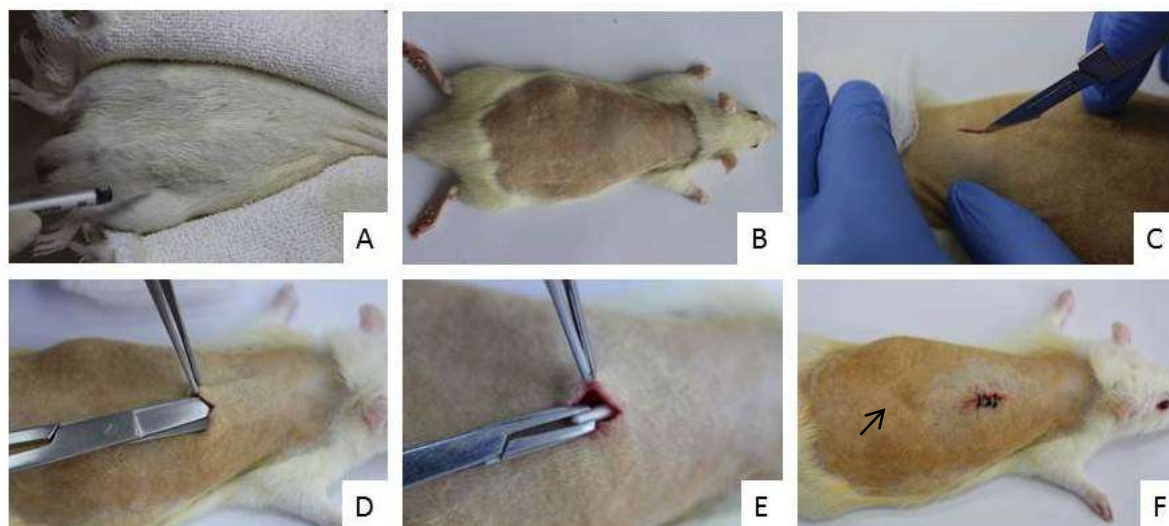
Medicação	Composição	Fabricante
Calen*	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400	SS. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brasil
BIO-C TEMP**	Silicatos de cálcio + aluminato de cálcio+ óxido de cálcio + tungstato de cálcio + óxido de titânio + resina base	Angelus, Londrina, Brasil

Fonte: Elaboração própria.

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com 0,08 mL/100 g (80 mg/kg) de peso corporal de cloridrato de cetamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), associada a 0,04 mL/100 g (8 mg/kg) de peso corporal de cloridrato de xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brasil), administrada com seringa e agulha de insulina. Após a analgesia, procedeu-se a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal e com um bisturi com lâmina nº 15 foi realizada uma incisão paralela ao eixo axial do animal com aproximadamente 1 cm de extensão. Com uma pinça de ponta

reta, os tubos de polietileno (10 mm de comprimento x 1,5 mm de diâmetro), previamente esterilizados em óxido de etileno, contendo ou não um dos medicamentos, foram implantados no subcutâneo dorsal dos animais¹⁻⁴. Foram utilizados 2 tubos do mesmo grupo em cada animal, totalizando 10 implantes para cada material por período. Após a inserção dos tubos na bolsa criada no subcutâneo, as bordas da pele foram suturadas usando o fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP-Brasil) (Figura 1A-1F). Os animais foram observados até a recuperação da anestesia. Para minimizar o desconforto pós-operatório dos animais, foi administrada dipirona sódica, na dosagem de 0,03 mg para cada 100 g de peso corporal nos três primeiros dias após a cirurgia.

Figura 1 - Implante nos tecidos do subcutâneo



Sequência dos procedimentos cirúrgicos para implantação subcutânea. **Figura 1A** - Contenção do animal e administração da anestesia por via intraperitoneal. **Figura 1B** - Após a anestesia realizou-se tricotomia e antissepsia com solução de iodo a 5%. **Figura 1C** - Com um bisturi foi realizada a incisão no sentido crânio caudal. **Figura 1D** - Divulsão dos tecidos com uma tesoura de ponto romba. **Figura 1E** - Inserção dos tubos de polietileno preenchidos pelas medicações. **Figura 1F** - Sutura com fio de seda. A seta indica o local do tubo no subcutâneo.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

COLETA DE SANGUE

Após 7, 15, 30 e 60 dias à colocação dos implantes no subcutâneo, os animais foram anestesiados, como previamente descrito, e realizou-se a punção cardíaca do ventrículo esquerdo com tubo a vácuo (Vacuette®, Z soro ativador de coágulo gel; Greiner Bio-One Brasil Produtos Médicos Hospitalares Ltda.,

Americana, SP, Brasil) acoplado a uma agulha (Med Goldman Indústria e Comércio Ltda., Manaus, AM, Brasil) conectada a um adaptador BD Vacutainer® (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., Curitiba, PR, Brasil) (Figura 2A). Após a coleta, os tubos contendo o sangue de cada animal foram mantidos em temperatura ambiente por quinze minutos para a formação do coágulo. Em seguida, os tubos foram centrifugados (Excelsa® II 206 BL; Fanem Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) a 3500 rpm durante 10 minutos para a separação entre o soro e o coágulo. As amostras foram armazenadas à -80° C, até o momento de encaminhamento para análise laboratorial dos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), cálcio, fósforo e fosfatase alcalina (ALP).

ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Previamente ao encaminhamento do soro para análise as amostras foram removidas do freezer a - 80° C e mantidas em freezer -20°C por 12 horas. Após esse período o soro foi encaminhado para o no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas (Araraquara, SP, Brasil). A partir do soro, em um analisador automático multiparamétrico (Cobas Íntegra, São Paulo, SP-Brasil) foi realizada a quantificação dos níveis séricos TGO, TGP, cálcio, fósforo e ALP de cada animal. Para análise de TGO e TGP foram utilizadas as amostras correspondente aos períodos experimentais de 7 e 60 dias, TGO e TGP e é determinada pela medida da diminuição da absorbância a 320nm. Os resultados da reação para TGO e TGP foram automaticamente convertidos de $\mu\text{kat/L}$ para U/L. As concentrações de cálcio, fósforo e ALP foram determinados utilizando o kit de ensaio Calcium Arsenazo III (Beckman Coulter, São Paulo, SP, Brasil), o Inorganic Phosphorus (Beckman Coulter) e o Alkaline Phosphatase (Beckman Coulter), respectivamente. As análises para avaliar as concentrações de cálcio, fósforo e ALP foram realizadas em todas as amostras de todos os períodos (7, 15, 30 e 60 dias). A absorbância da amostra foi lida utilizando um espectrofotômetro (Hitachi, modelo U 1100, Tóquio, Japão). A absorbância de cálcio foi determinada a 660/700nm, fósforo a 340nm e ALP a 410/480 nm. A média dos valores dos cinco animais do grupo controle constituíram os valores de referência de cada parâmetro.

Figura 2 - Obtenção das amostras

Punção cardíaca e remoção dos implantes. **Figura 2A** - Após anestesia, tricotomia, antissepsia com solução de iodo a 5%, com uma tesoura realizou-se a incisão no tórax para localização do coração e punção cardíaca foi realizada. **Figura 2B** - Incisão da pele para localização e remoção do implante e tecidos adjacentes para o processamento histológico; a seta indica o tubo de polietileno envolvido pela cápsula. **Figura 2C** - Porção da pele removida contendo o implante no subcutâneo.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a coleta de sangue, os implantes com os tecidos circundantes foram removidos e fixados em solução de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) tamponado com fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,2, durante 48 horas. Após a fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas, embebidas em parafina líquida (60°C) e incluídas em parafina (Figura 2B-2C). Os espécimes foram incluídos de maneira a obter cortes longitudinais em relação ao longo eixo dos tubos de polietileno. Com um micrótomo (Micron, modelo HM 325) foram obtidos, a partir dos blocos, cortes longitudinais com 6 µm de espessura; de cada amostra foram obtidos aproximadamente 40 cortes, sendo que foram aderidos 2 cortes em cada lâmina de vidro. De cada implante, 5 lâminas equidistantes foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise morfológica das cápsulas adjacentes, mensuração da espessura da cápsula e quantificação do número de células inflamatórias. Para obtenção do conteúdo de colágeno birrefringente nas cápsulas, 3 lâminas com cortes não seriados foram corados com picrosirius-red. Também foram utilizadas 3 lâminas equidistantes coradas com tricrômico de Masson para quantificação do número de fibroblastos. Cortes dos implantes também foram aderidos as lâminas de vidro silanizadas para a realização das reações imuno-histoquímicas para detecção de IL-6, IL-10, OCN e OPN.

ANÁLISE MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA

A partir dos cortes corados com H&E, foi realizada a descrição das características morfológicas das cápsulas adjacentes aos implantes considerando a presença ou não de processo inflamatório, a sua extensão e o tipo de células inflamatórias, presença de células gigantes multinucleadas, necrose, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas.

O número de células inflamatórias foi obtido a partir de 3 cortes não seriados (distância entre os cortes de 100 μm) de cada implante. Esta quantificação foi realizada nos implantes de 5 animais por grupo em cada período. As imagens da cápsula adjacente à abertura dos tubos de polietileno na sua porção média foram capturadas com objetiva de 40x. Com auxílio de um programa de análise de imagens, o número de células inflamatórias foi computado numa área padronizada da cápsula de 0,09 mm^2 . Assim, em cada implante as células inflamatórias foram computadas numa área total de 0,27 mm^2 , valor total das 3 imagens capturadas de cada implante. A densidade numérica foi calculada a partir do número total de células inflamatórias computado em cada implante (somatória dos 3 cortes) dividido pela área total (0,27 mm^2) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/ mm^2 . Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo de acordo com o período¹⁻⁴ (Figura. 3).

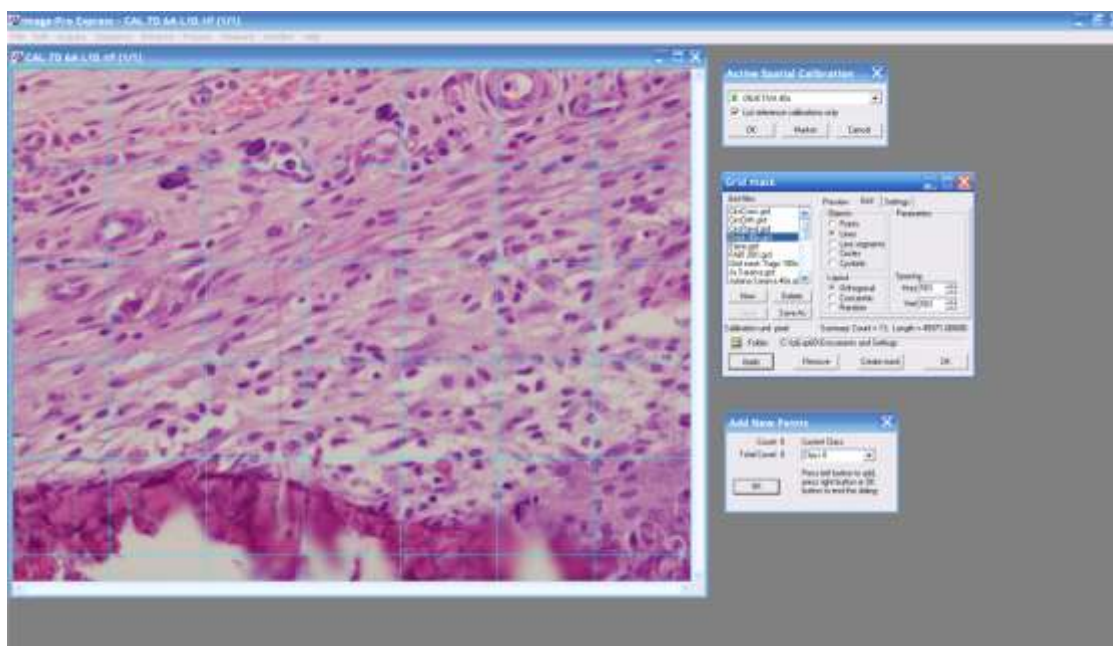
ANÁLISE MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA

A partir dos cortes corados com H&E, foi realizada a descrição das características morfológicas das cápsulas adjacentes aos implantes considerando a presença ou não de processo inflamatório, a sua extensão e o tipo de células inflamatórias, presença de necrose, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas.

O número de células inflamatórias foi obtido a partir de 3 cortes não seriados (distância entre os cortes de 100 μm) de cada implante. Esta quantificação foi realizada nos implantes de 5 animais por grupo em cada período. As imagens da cápsula adjacente à abertura dos tubos de polietileno na sua porção média foram capturadas com objetiva de 40x. Com auxílio de um programa de análise de imagens, o número de células inflamatórias foi computado numa área padronizada da cápsula de 0,09 mm^2 . Assim, em cada implante as células inflamatórias foram computadas numa área total de 0,27 mm^2 , valor total das 3 imagens capturadas de

cada implante. A densidade numérica foi calculada a partir do número total de células inflamatórias computado em cada implante (somatória dos 3 cortes) dividido pela área total ($0,27\text{mm}^2$) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/ mm^2 . Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo de acordo com o período¹⁻⁴ (Figura 3).

Figura 3 - Método quantitativo: células inflamatórias



Print screen” de uma fotomicrografia mostrando uma porção da cápsula. A imagem, previamente capturada, é aberta no programa de análise de imagens (Image-Pro Express, Olympus). Note que, após calibração, uma grade reticular contendo 30 intersecções/pontos (sistema teste) é sobreposta à imagem; esta grade é usada somente para auxiliar na contagem, serve como uma “guia” durante a contagem das células inflamatórias. Coloração H&E.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

ESPESSURA DAS CÁPSULAS ADJACENTES AOS IMPLANTES

Foram utilizados três cortes não seriados (intervalo mínimo de $100\ \mu\text{m}$) corados com H&E de cada implante; esta mensuração foi realizada em 5 implantes por grupo em cada período. As imagens foram capturadas da porção central das cápsulas adjacentes aos materiais implantados; estas imagens foram obtidas com a objetiva de 4x. Utilizando o programa de análise de imagens, uma linha perpendicular a partir da superfície mais interna da cápsula até o seu limite com os tecidos adjacentes foi traçada; esta linha traçada representou a espessura da cápsula em micrômetros (μm). O valor total da espessura das cápsulas em cada

animal foi obtido a partir do valor médio obtido nas medidas dos três cortes/implante obtendo-se, assim, um valor da espessura em μm . Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo de acordo com o período⁴⁻⁵ (Figura. 4).

Figura 4 - Mensuração da espessura das cápsulas

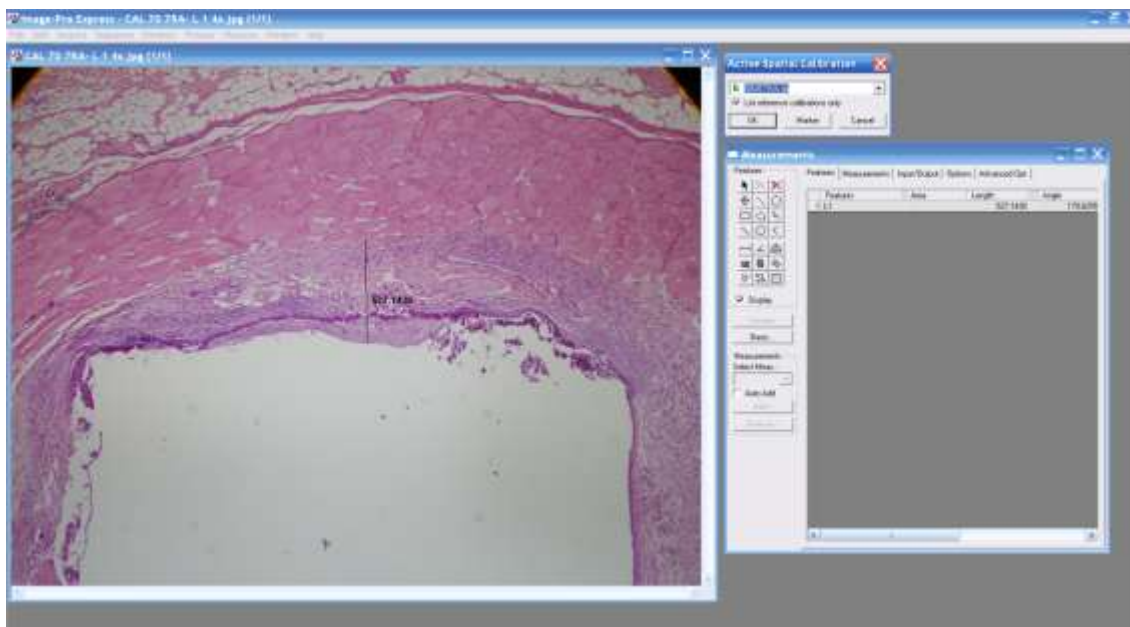


Imagem ilustrativa da mensuração da espessura das cápsulas. “Print screen” de uma fotomicrografia mostrando uma porção da cápsula e parte dos tecidos adjacentes. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Image-Pro Express, Olympus), a fotomicrografia é aberta, realizada a calibração do sistema e, subsequentemente, com uso da ferramenta “measurement”, é traçada uma linha a partir da superfície da cápsula até o limite com os tecidos adjacentes; o programa fornece a extensão da linha traçada que representa a espessura da cápsula (em μm). Coloração H&E.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

MENSURAÇÃO DO CONTEÚDO DE COLÁGENO BIRREFRINGENTE

Para a estimativa do conteúdo de colágeno foram utilizadas três cortes não seriados, com distância mínima de 100 μm , corados com picrosirius-red. As imagens foram capturadas com o microscópio de luz (BX51, Olympus) equipado com filtros para fornecer iluminação polarizada. As imagens foram obtidas com a objetiva de 40x e todas as imagens foram capturadas com os parâmetros referentes à intensidade de luz, abertura do diafragma de campo, diafragma do condensador e tempo de exposição padronizados. A estimativa do conteúdo de colágeno foi realizada com o processador de imagens *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), sendo que o número de pixels de cada frequência de cor

(vermelho, laranja, amarelo e verde) foi calculado a partir da porcentagem de material birrefringente ocupado no valor total de pixels da imagem capturada^{6,7} (Figura 5).

Figura 5 - Estimativa de colágeno birrefringente

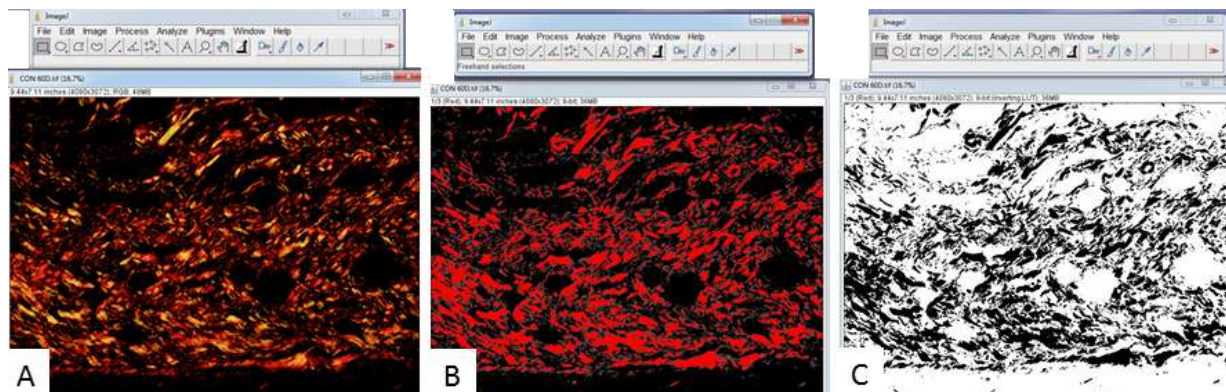


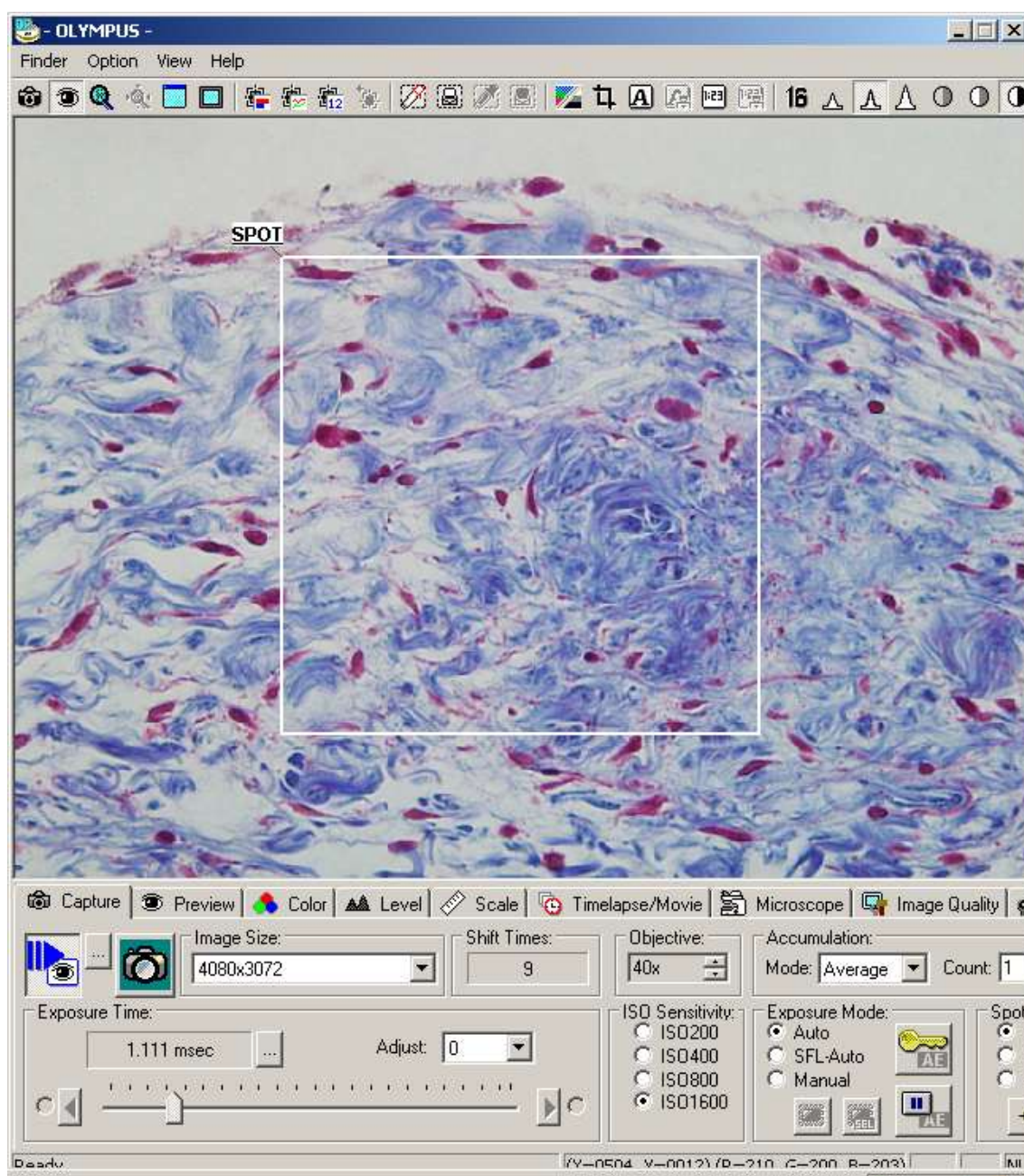
Imagem ilustrativa da estimativa de colágeno birrefringente. “Print screen” de uma fotomicrografia mostrando uma porção da cápsula capturada usando a objetiva de 40x. A imagem foi capturada com a câmera DP-71 acoplada ao microscópio Olympus. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Image-J), a fotomicrografia foi aberta e, após calibração a porcentagem ocupada pelos matizes (vermelho/alaranjado, amarelo e verde) foi calculada a partir do número de pixels em cada faixa de matiz. Coloração Picrosirius-red.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

DENSIDADE NUMÉRICA DE FIBROBLASTOS

O número de fibroblastos por mm^2 nas cápsulas adjacentes aos implantes foi obtido a partir de cortes corados com tricrômico de Masson. O número destas células foi estimado a partir de três cortes não seriados de cada implante, manteve-se um intervalo mínimo de 100 μm entre os cortes. Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51), usando a objetiva de 40x (aumento final de 695x), imagens do tecido adjacente aos materiais implantados foram capturadas. Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão) foi realizada a contagem dos fibroblastos, em cada corte, em uma área teste de aproximadamente 0,09 mm^2 da cápsula. Os fibroblastos foram identificados de acordo com sua morfologia, ou seja, considerando o seu formato fusiforme ou elíptico. O valor total de fibroblastos em cada espécime (obtido a partir das áreas dos três cortes/implante) foi dividido pela área total (0,27 mm^2), obtendo o valor de fibroblastos/ mm^2 . Ao final, foi calculada a média para cada grupo em cada período⁷ (Figura 6).

Figura 6 - Imagem ilustrativa da captura de uma porção da cápsula



“Print screen” de uma fotomicrografia mostrando uma porção da cápsula capturada usando a objetiva de 40x. A imagem foi capturada com a câmera DP-71 acoplada ao microscópio Olympus. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Image-Pro Express, Olympus). Tricômico de Masson.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

REAÇÃO HISTOQUÍMICA DE VON KOSSA E ANÁLISE AO MICROSCÓPIO DE POLARIZAÇÃO

O método de von Kossa foi utilizado para avaliar a deposição de cálcio nas cápsulas adjacentes às extremidades dos tubos implantados. Este método foi realizado nos espécimes de todos os grupos e períodos. Os cortes desparafinizados

foram incubados em solução aquosa contendo 5% de nitrato de prata, sob a ação de uma lâmpada incandescente (100 watts), durante 1 hora. Após a incubação, os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e, subsequentemente, os cortes foram imersos em 5% de hipossulfito de sódio por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados rapidamente em água corrente e durante 5 minutos em água destilada. Após a lavagem, os cortes foram corados com a solução de picrossirius-red. Subsequentemente, os cortes foram lavados, desidratados e montados em meio resinoso (Permunt®, Fisher Scientific, New Jersey, USA) para análise ao microscópio de luz.

Cortes não corados também foram analisados sob iluminação polarizada para avaliar a presença de estruturas birrefringentes nas cápsulas^{4,8}.

DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE IL-6

Para a detecção de interleucina-6 foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-IL-6 (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA; código: ab 9324). Após desparafinização e hidratação, foi realizada a recuperação antigênica; para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos a dois ciclos de micro-ondas por 20 minutos a 96-98°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M (PBS) por 15 minutos. Para a inativação da peroxidase endógena, os cortes foram imersos por 30 minutos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5%. Após nova lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 20 minutos com albumina de soro bovino (BSA) a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo anti-IL-6 na diluição a 1: 400 em câmara úmida a 4° C por 16 horas. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com o kit *Labeled StreptAvidin-Biotin* (Universal Dako LSAB, Dako Inc., Carpinteria, CA, EUA; K0675) por 60 minutos à temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (substrato ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 3 min. Os cortes foram contracorados com hematoxilina, durante 8 minutos. Subsequentemente, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Como controle negativo, no passo da incubação com o anticorpo primário os cortes foram incubados com soro não imune; as demais etapas foram realizadas sem qualquer modificação.

DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE IL-10

Para a detecção de interleucina-10 foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-IL-10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; código SC-8438). Após desparafinização e hidratação, foi realizada a recuperação antigênica; para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos a dois ciclos de micro-ondas por 25 minutos a 96-98°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01 M por 15 minutos. Para a inativação da peroxidase endógena, os cortes foram imersos por 30 minutos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5%. Após nova lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 20 minutos com BSA a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-IL-10 na diluição de 1:100 em câmara úmida a 4° C por 16 horas. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com o kit Labeled StreptAvidin-Biotin (Universal Dako LSAB, Dako Inc., Carpinteria, CA, EUA; K0675) por 60 minutos à temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (substrato ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 3 min. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi, durante 8 minutos, desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Os cortes usados como controle negativo foram submetidos às mesmas etapas, com exceção da incubação com o anticorpo primário; nesta etapa os cortes foram incubados em soro de camundongo não imune.

DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE OCN

Para a detecção de osteocalcina foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho anti-OCN (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA; code SAB1306277). Após desparafinização e hidratação, foi realizada a recuperação antigênica; para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos ao tratamento com micro-ondas por 15 minutos a 96-98°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01 M (PBS) por 15 minutos. Para a inativação da peroxidase endógena, os cortes foram imersos por 30 minutos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5%. Após nova lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 20 minutos com BSA a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri,

EUA) à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo anti-osteocalcina na diluição de 1:500 em câmara úmida a 4° C por 16 horas. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com o *kit Labeled StreptAvidin-Biotin* (Universal Dako LSAB, Dako Inc., Carpinteria, CA, EUA; K0675) por 60 minutos em temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (substrato ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 3 min. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi, durante 8 minutos, desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Como controle negativo, no passo da incubação com o anticorpo primário os cortes foram incubados com soro não imune; as demais etapas foram realizadas sem qualquer modificação.

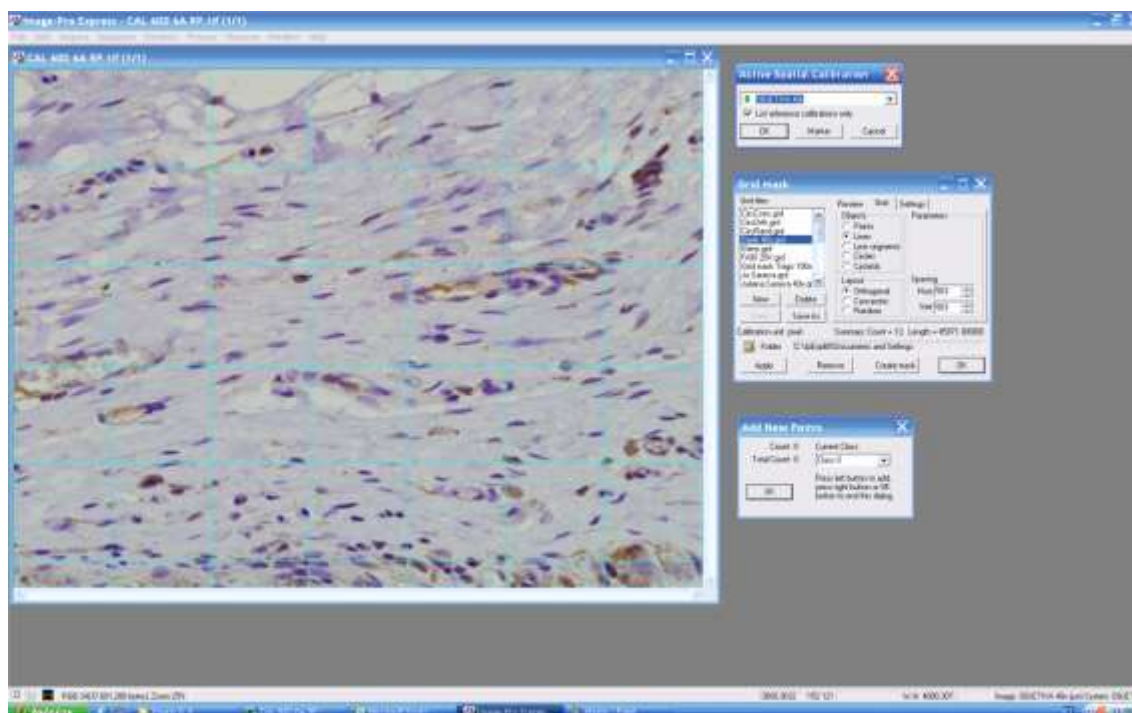
DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE OPN

Para a detecção de osteopontina foi utilizado o anticorpo monoclonal de rato anti-OPN (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; code: ab 166709). Após desparafinização e hidratação, foi realizada a recuperação antigênica; para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos ao tratamento de 2 ciclos no micro-ondas por 20 minutos a 96-98°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01 M (PBS) por 20 minutos. Para a inativação da peroxidase endógena, os cortes foram imersos por 30 minutos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5%. Após nova lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 20 minutos com BSA a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo anti-osteopontina na diluição de 1:100 em câmara úmida a 4° C por 16 horas. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com o *kit Labeled StreptAvidin-Biotin* (Universal Dako LSAB, Dako Inc., Carpinteria, CA, EUA; K0675) por 60 minutos em temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (substrato ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 3 minutos. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi. Como controle negativo, no passo da incubação com o anticorpo primário os cortes foram incubados com soro não imune; as demais etapas foram realizadas sem qualquer modificação.

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS IMUNOPositIVAS PARA IL-6, IL-10, OCN E OPN

Com o objetivo de verificar se houve diferenças entre os grupos e períodos, o número de células imunopositivas para IL-6, IL-10, OCN e OPN foi estimado nas cápsulas dos implantes de cada grupo em todos os períodos. Com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão), uma área padrão de $0,09\text{mm}^2$ da cápsula adjacente à abertura do tubo implantado foi capturada, em aumento de 40x. O número de células imunopositivas para cada reação foi computado com auxílio de um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão), como ilustrado na Figura 7. Assim, o número de células imunopositivas/ mm^2 de cápsula foi obtido para cada implante; posteriormente, calculou-se a média para cada grupo em cada período.

Figura 7 - Quantificação da reação imuno-histoquímica



“Print screen” de uma fotomicrografia mostrando uma porção da cápsula capturada usando a objetiva de 40x. A imagem foi capturada com a câmera DP-71 acoplada ao microscópio Olympus. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Image-Pro Express, Olympus), a fotomicrografia foi aberta e, após calibração, uma grade reticular contendo 30 intersecções/pontos (grade) foi sobreposta à imagem; esta grade foi usada somente para auxiliar como uma “guia” durante a contagem de células imunopositivas.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos) os dados obtidos foram submetidos a análise de variância two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

APÊNDICE B – METODOLOGIA DA PUBLICAÇÃO 3

AVALIAÇÃO DO PH

Tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno foram preenchidos com as medicações (Quadro 1). Os tubos foram submersos em frascos plásticos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Os frascos foram mantidos em estufa à 37 °C. Após 12 horas de imersão, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos com o auxílio de uma pinça clínica. A solução resultante de cada um dos frascos foi utilizada para realizar a aferição do pH. Este procedimento foi repetido pelos períodos de 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

O pH das soluções foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) ajustado para temperatura ambiente (25°C). Previamente à aferição do pH, o dispositivo foi calibrado com as soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0 que foram utilizadas para averiguar a calibragem do pHmetro durante todo o experimento (Figura 8).

Figura 8 – Ensaio de pH



A imagem mostra o pHmetro com o eletrodo mergulhado num frasco para mensurar a concentração de íons de hidrogênio na solução.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

RADIOPACIDADE

Baseado nas normas ISO 6876/2012⁹ foi confeccionado um molde em resina acrílica transparente (n=6/grupo) com 10 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura foram preenchidos pelas medicações. Subsequentemente, os moldes contendo os materiais e uma escala de alumínio, com espessura variável (de 2 a 16 mm, em incrementos de 2-mm), foram posicionados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY). Um aparelho de raios-X Focus (Instrumentarium Dental, Tuusula, Finland) operando a 60 kV, 7 mA, 0.32 pulsos por segundo foi utilizado para a tomada radiográfica, que foi realizada a uma distância focal de 33 cm. Na sequência, os filmes foram processados em uma processadora automática (Dent-X 9000, Dent-X, Elmsford, EUA) e, em seguida, foram fotografados com uma câmera semiprofissional (Canon, Tokio, Japão) e uma lente macro de 100 mm, utilizando os seguintes parâmetros: distância lente-objeto de 40 cm, ISO 100, abertura do obturador de 7,1 e velocidade do obturador de 1/100³. As radiografias foram digitalizadas com escâner (SnapScan 1236-Agfa, Alemanha) e avaliados usando o *software* UTHSCSA *ImageTool* para Windows versão 3.00, para determinar a equivalência da radiopacidade em milímetros de alumínio.

ESCOAMENTO

O escoamento foi avaliado de acordo com a norma ISO 6876/2012⁹. Por meio de seringa de 1 mL, 0,05 mL das medicações Bio-C Temp e Calen foram colocadas no centro de uma placa de vidro 40 mm x 40 mm x 5 mm de espessura e 20 g de massa (n = 10/grupo). Em seguida, outra placa de vidro com as mesmas dimensões e mesma massa da primeira, foi cuidadosamente posicionada sobre o centro do material depositado. Subsequentemente um dispositivo metálico de 100 g foi posicionado sobre a segunda placa, totalizando 120 g, sendo o conjunto mantido por 10 minutos. Após este período, foi medido o maior e o menor diâmetro produzido pelas medicações, com o auxílio de um paquímetro digital. Quando a diferença observada entre o maior e o menor diâmetro foi menor que 1 mm, o valor médio foi registrado (Figura 9).

Figura 9 - Teste de escoamento



Representação do teste de escoamento. Numa placa de vidro foi colocado 0,05 mL de medicação sobre a qual foi posicionada uma placa de vidro e um peso de 100 g.

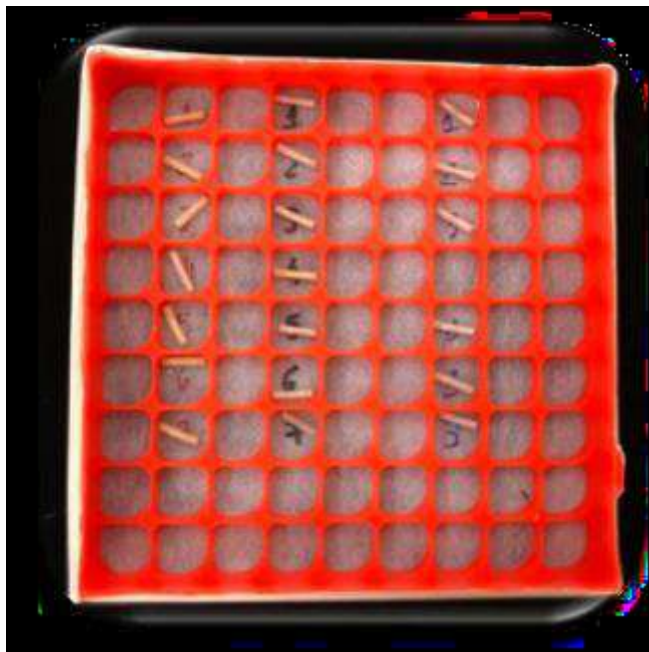
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

SOLUBILIDADE

Após estudos pilotos, tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno foram preenchidos com as medicações e armazenados em uma estufa a 37° C e 95% de umidade, por 24 horas. Decorrido este período, os espécimes foram pesados em balança eletrônica analítica (OHAUS Adventurer[®], Nova Jersey, EUA) e, subsequentemente, os tubos foram submersos em 7,5 ml de água destilada e distribuídos em dois 2 subgrupos de acordo com o período de armazenamento em estufa a 37° C, por 7 e 14 dias (n = 6/grupo). Após os períodos experimentais, os espécimes foram removidos dos recipientes secos com papel absorvente e mantidos em desumidificador até a estabilização da massa final (em torno de 14 dias). As pesagens foram realizadas a cada 24 horas, três vezes para cada espécime, utilizando balança de precisão. A perda de massa foi expressa com a porcentagem da massa original, tendo sido calculada através da fórmula: $S =$

$(\text{Massa Inicial} - \text{Massa Final}) / \text{Massa Inicial} \times 100$. Esta metodologia foi repetida para imersão dos tubos de polietileno preenchidos com as medicações em imersão em tampão fosfato de sódio (PBS 1X) (Figura 10).

Figura 10 - Representação do teste de solubilidade



Tubos de polietileno preenchidos pelas medicações separados em aparato e mantidos em desumidificador.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

ALTERAÇÃO VOLUMÉTRICA E CAPACIDADE DE PREENCHIMENTO EM MICRO-CT

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP - Protocolo nº 5.323. 273 (Anexo B).

Foram utilizados 12 pré-molares inferiores canais únicos, retos, arredondados ou ovalados, com curvatura menor que 10°, com ausência de tratamento endodôntico prévio e de reabsorção radicular externa ou interna. Os dentes foram radiografados no sentido mesio-distal utilizando a radiografia digital (Marne-la-Vallée, France) e aparelho Spectro 70X Eletronic (Dabi Atlante Inds. Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brazil), a 70 kVp, 8 mA e 0.4 segundos de exposição, para seleção.

As coroas foram removidas com disco diamantado duplo (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) e o comprimento das raízes foi padronizando em 15 mm. Para

exploração inicial do canal radicular foi utilizado a lima tipo K #10 (Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland) até o comprimento de trabalho (CT) de 14 mm. Os dentes foram preparados, utilizando o sistema Easy ProDesign Logic (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, MG, Brasil) acionados em motor elétrico VDW SILVER (VDW GmbH, Munique, Alemanha). O instrumento ProDesign Logic 25.01 foi utilizado com a cinemática rotatória em velocidade de 350 rpm e torque 1.5 N/cm com suaves movimentos de avanço e recuo até o CT. Os instrumentos 25.06 e 40.05 foram empregados com velocidade de 600 rpm e torque de 2N/cm com movimento de avanço de recuo até atingir o CT. Em cada etapa do preparo, todos os instrumentos foram limpos com gaze umedecida em água destilada.

A solução irrigadora durante todo preparo foi realizada com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (Dino Cloro, Araraquara, Brasil) utilizando uma seringa de 5mL (Ultradent Products Inc., South Jordan, USA) com agulha Navitip 30G 21 mm (Ultradent Products Inc., South Jordan, USA) a 2 mm aquém do CT com movimentos de entrada e saída com fluxo contínuo e aspiração concomitante após cada troca do instrumento (2,5 mL). Após instrumentação, realizou-se a irrigação final com 5 mL de NaOCl a 2,5% seguido de 2 mL de EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil), sob agitação, por 3 minutos, utilizando lima tipo K #40 (Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland) e 5mL de NaOCl a 2,5% e, posteriormente, 5 mL de soro fisiológico. Finalizando, os canais foram secos com cone de papel absorvente estéril 40 (Tanari Indústria Ltda., São Paulo, Brasil)¹⁰.

Os parâmetros de escaneamento estabelecidos pelo teste piloto foram: voltagem de 80kv, corrente de 300 μ A, filtro de cobre e alumínio (Cu + Al) e rotação de 360°. Após o preparo biomecânico, foi realizado um escaneamento com o Micro-CT SkyScan 1176 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) a uma resolução de 35 μ m para o cálculo do percentual volumétrico dos canais radiculares e randomização dos grupos. O volume dos canais radiculares foi mensurado utilizando micro-CT através do *software* CTan (V1.15.4.0, Bruker-MicroCT). Os dentes foram distribuídos em 2 grupos, Bio-C Temp (n=6) e Calen (n=6), com amostragem aleatória estratificada, considerando o volume pós preparo dos canais radiculares¹¹.

Subsequente ao preenchimento dos canais com as medicações, de acordo com recomendação dos fabricantes, foi realizado um novo escaneamento a uma resolução de 9 μ m para o cálculo do volume de preenchimento inicial. Após 14 dias imersos em PBS e acondicionados em estufa a 37°C as amostras foram

escaneadas, seguindo os mesmos parâmetros, para o cálculo da alteração volumétrica após imersão. Com o auxílio do software NRecon (V1.6.10.4, Bruker-MicroCT), foi realizada a reconstrução das imagens (Figura 11). Os parâmetros de *smoothing*, *beam hardening*, e *ring artifacts* foram definidos para cada material. Os parâmetros utilizados para o Bio-C Temp foram de 10 para *smoothing*, 1 para *ring artefacts correction*, e 10 para *beam hardening correction*. Para o Calen (os parâmetros utilizados foram: 4 para *smoothing*, 5 para *ring artefacts correction*, e 50 para *beam hardening correction*). As imagens reconstruídas dos diferentes períodos foram sobrepostas (Figura 12) utilizando o software Data Viewer (V1.5.2.4, Bruker-MicroCT) permitindo que a quantidade de medicação no interior do canal fosse analisada nas diferentes etapas experimentais. Para a realização da análise quantitativa (Figura 13), foi utilizado o software CTAn. Para a obtenção da alteração volumétrica foi utilizada a seguinte fórmula: Alteração volumétrica = $[\text{volume final} \times 100 / \text{volume inicial}] - 100$. Os escaneamentos após o preenchimento com as medicações também foram analisados para avaliação da capacidade de preenchimento das medicações. A capacidade de preenchimento do canal foi avaliada de acordo com o volume de preenchimento (%). Além disso, imagens tridimensionais foram realizadas no software CTVox (v.3.2; Bruker-microCT).

Figura 11 - Imagem do micro-CT

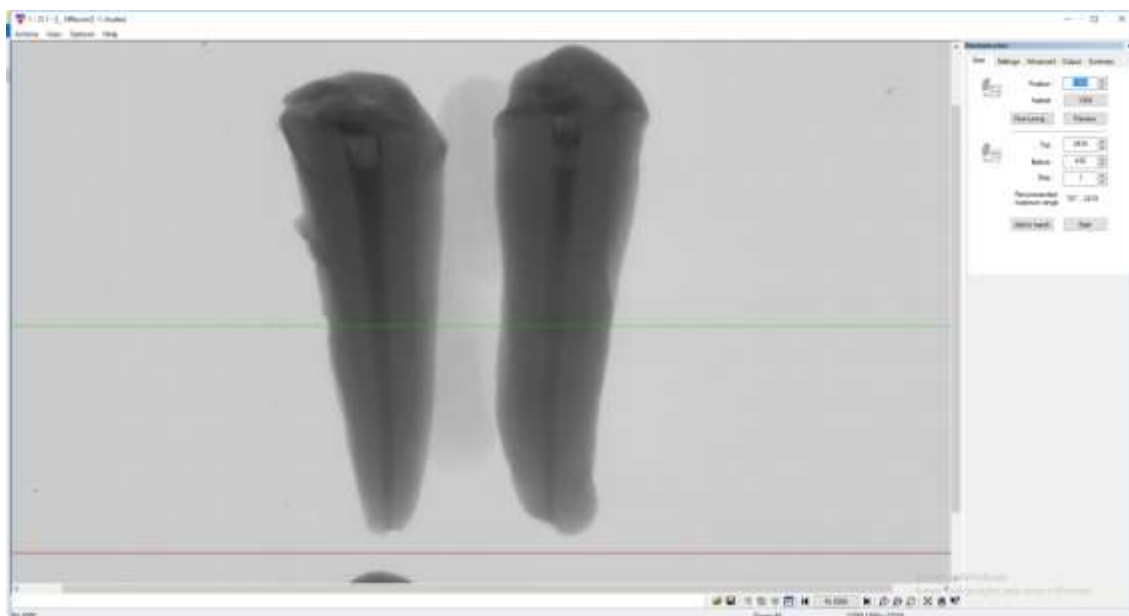


Imagem demonstrativa ilustrando a reconstrução feita com o programa Nrecon.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 12 – Sobreposição das imagens obtidas com o micro-CT

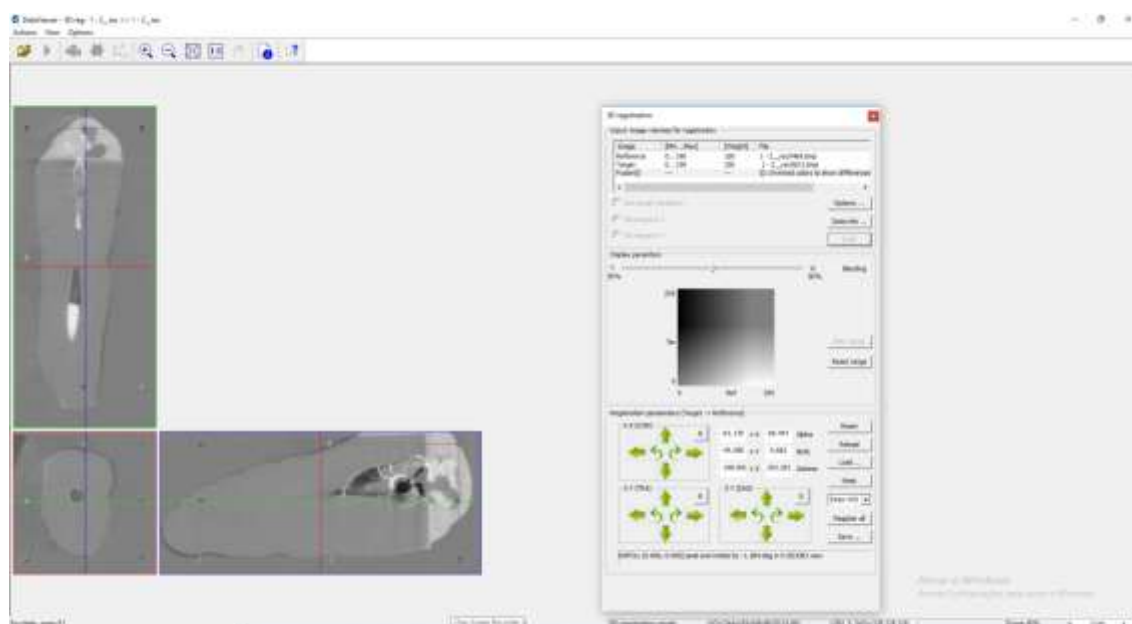
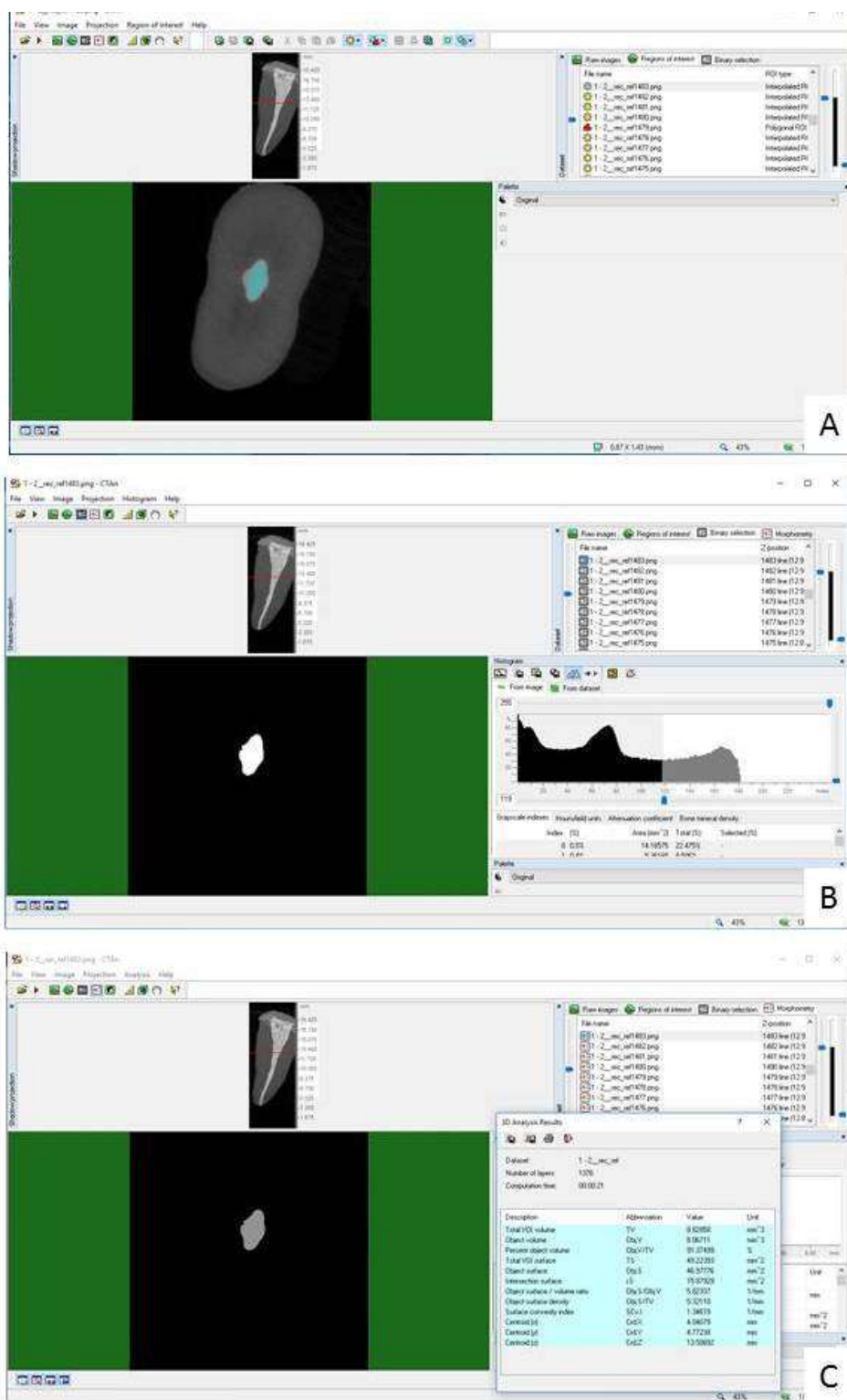


Imagem demonstrativa da sobreposição das imagens (após reconstrução), utilizando o software Data Viewer.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 13A - Imagem demonstrativa da análise com o programa CTAn



Definição do Roi, área de interesse. **Figura 13B** - Binarização das imagens para determinar o *Thresholding*. **Figura 13C** - Ferramenta “custom processing” foi utilizada, permitindo que “Task lists” elaborados através de cálculos matemáticos fossem empregados para os diferentes resultados a serem obtidos.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos). Os valores de pH e solubilidade obtidos foram submetidos a análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores da radiopacidade, escoamento, capacidade de preenchimento e alteração volumétrica foram submetidos ao teste t ($p \leq 0,05$)

REFERÊNCIAS DOS APÊNDICES A E B*

1. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100(7): 1773-81.
2. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(12): 4336-45.
3. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agente of calcium silicated-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(8): 2015-25.
4. Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci Rep*. 2020; 10: 7173.
5. Alves-Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020; 46: 1470-7.
6. Saraiva JA, da Fonseca TS, Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater*. 2018; 13(3): 1-12.
7. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, da Fonseca TS, Bernardi MIB, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M et al. Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. *Int Endod J*. 2017; 50(Suppl 2): e95-e108.
8. Hoshino RA, Silva GFD, Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E et al. Physical properties, antimicrobial activity and in vivo tissue response to Apexit Plus. *Materials (Basel)*. 2020; 13(5): 1171.
9. International Organization for Standardization (ISO). ISO 6876: root canal sealing materials. Geneva; 2012.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Pinto JC, Pivoto-João MMB, Espir CG, Ramos MLG, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Micro-CT evaluation of apical enlargement of molar root canals using rotary or reciprocating heat-treated NiTi instruments. *J Appl Oral Sci.* 2019; 27: e20180689.
11. Santos-Junior AO, Tanomaru-Filho M, Pinto JC, Tavares KIMC, Pivoto-João MMB, Guerreiro-Tanomaru JM. New ultrasonic tip decreases uninstrumented surface and debris in flattened canals: a micro-computed tomographic study. *J Endod.* 2020; 46(11): 1712-8.

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



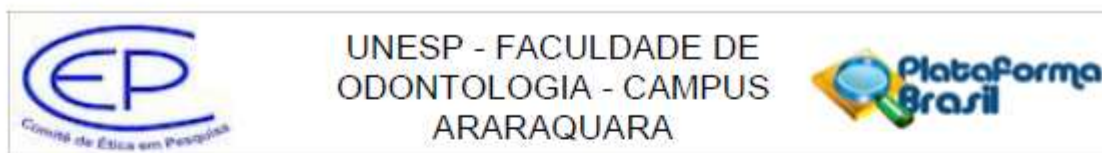
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DA MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE BIOCERÂMICO BIO-C TEMP (ÂNGELUS)"***, registrada com o nº 22/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Paulo Sérgio Cerri** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 28/08/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato – Holtzman
Nº de animais	60
Peso/Idade	270-300g – adultos jovens
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM HUMANOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise da alteração volumétrica e remoção da medicação intracanal à base de silicato de cálcio, BIO-C TEMP

Pesquisador: Paulo Sérgio Cerri

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 11714518.3.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.323.273

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20 de maio de 2022.

Camila Soares Lopes