

**LUCAS MOREIRA MAIA**

**MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE  
BIOCERÂMICO E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO:  
*EFEITOS SOBRE A ATIVIDADE DE  
MACRÓFAGOS***

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2022**

Lucas Moreira Maia

**MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE BIOCERÂMICO E  
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO: *EFEITOS SOBRE A ATIVIDADE DE  
MACRÓFAGOS***

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia- área de concentração em Endodontia

**Orientador:** Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

Belo Horizonte  
2022

## Ficha Catalográfica

M217m Maia, Lucas Moreira.  
2022 Medicação intracanal à base de biocerâmico e hidróxido  
T de cálcio: efeitos sobre a atividade de macrófagos / Lucas  
Moreira Maia. -- 2022.

60 f. : il.

Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Macrófagos. 3.  
Citocinas. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Fagocitose.  
I. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III.  
Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

## **MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE BIOCERÂMICO E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO; EFEITOS SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS**

### **LUCAS MOREIRA MAIA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, área de concentração ENDODONTIA.

Aprovada em 31 de outubro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho - Orientador  
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof(a). Warley Luciano Fonseca Tavares  
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof(a). Ricardo Reis de Oliveira  
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof(a). Frank Ferreira Silveira  
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC MG

Prof(a). Gil Moreira Júnior  
Universidade de Itaúna

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2022



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho, Professor do Magistério Superior**, em 31/10/2022, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Frank Ferreira Silveira, Usuário Externo**, em 31/10/2022, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Gil Moreira Junior, Usuário Externo**, em 31/10/2022, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Reis Oliveira, Coordenador(a)**, em 01/11/2022, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Warley Luciano Fonseca Tavares, Coordenador(a)**, em 03/11/2022, às 09:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_or\\_gao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_or_gao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1845429** e o código CRC **5DF4684D**.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por abençoar o meu caminho durante esse trabalho. Confesso que foi um exercício de fé, mas tenho a convicção que alimentou meu foco, minha força e minha persistência. Sou grato por mais essa vitória, pelas bênçãos que recaíram não só sobre mim, mas também sobre meus amigos e familiares. Tenho a convicção que Ele permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos, mas que em todos os momentos. É o maior Mestre que alguém pode conhecer.

Sou grato a minha esposa Olívia que nunca me recusou amor, apoio e incentivo. Obrigado, por compartilhar os inúmeros momentos de ansiedade e estresse. Sem você ao meu lado não seria concluído o trabalho.

Meu filho Davi, você é meu maior e melhor presente de Deus, por muitas vezes o papai precisou trocar momentos de brincadeira que tanto gostamos por estudos, mas ainda assim em cada minuto que passamos juntos você recarregou minhas forças com suas risadas gostosas e abraços carinhosos. Papai te ama.

Aos meus Pais, que sempre me apoiaram e por muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para sonhar os meus.

À minha avó, Celsa, por sempre ter uma palavra de amor, carinho e apoio constantes à minha procura de conhecimentos e conquistas.

Quero agradecer ao meu orientador Prof Dr Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho. Obrigado mestre por me exigir mais do que eu acreditava que seria capaz de realizar. Declaro aqui minha eterna gratidão pelo compartilhamento de seu conhecimento e tempo, bem como sua amizade.

Aos queridos colegas Leonardo Vaz e Wilson Bambirra, agradeço o companheirismo nesta jornada. Aos meus pastores Euler Fonseca e Paula e membros do GC Atos 29 por sempre intercederem por mim.

## RESUMO

O preparo mecânico-químico (PMQ) realizado durante o tratamento endodôntico é incapaz de promover completamente a sanificação do sistema de canais radiculares (SCR). Torna-se imperioso a colocação de uma medicação intracanal nas interconsultas do tratamento. Essas medicações devem apresentar-se biocompatíveis com os tecidos perirradiculares com os quais mantem contato direto. Várias composições de medicações intracanaís vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de garantir desejáveis propriedades antimicrobianas e, também, biocompatibilidade aos tecidos. Este trabalho teve como objetivo avaliar as medicações intracanaís Bio-C Temp (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) e o Ultracall XS (Ultradent), quanto aos seus efeitos sobre as respostas de macrófagos. Foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA-UFMG: 2/2020). Os experimentos foram realizados no laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Utilizou-se macrófagos murinos elicitados de camundongos C57BL/6 e BALB/c. Avaliou-se a viabilidade celular pelo método MTT e de Citometria de Fluxo, a aderência celular, a capacidade de fagocitose (na presença da levedura *S. boulardii*), a detecção da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO), a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 e, a atividade da arginase, na presença e na ausência de extratos das medicações. Os macrófagos inflamatórios foram elicitados do peritônio dos animais após a injeção de caldo Tioglicolato estéril a 3%. Após aspirados, os macrófagos foram centrifugados e a concentração celular final foi ajustada de acordo com cada ensaio proposto. Os resultados de viabilidade celular demonstraram que não houve interferência do Ultracal XS, em ambas as linhagens celulares, nas diferentes concentrações dos extratos, pelos dois métodos de análise. Contudo, O BioC-Temp, na concentração de 1:4, induziu uma redução significativa na viabilidade celular, tempo dependente, pelo método do MTT e de Citometria de Fluxo, em ambas as linhagens celulares. Os extratos de BioC-Temp e Ultracal XS não interferiram na capacidade de aderência celular de macrófagos BALB/c e C57BL/6, havendo, contudo, maior capacidade fagocitária pelos macrófagos C57BL/6 que os BALB/c, na presença ou ausência dos extratos de BioC-Temp e Ultracal XS. Viu-se uma maior produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos BALB/c que os C57BL/6 quando comparados às culturas celulares sem estímulo e estimuladas com Ultracal XS (1:8) e o BioC-Temp (1:8). Apenas as culturas tratadas com o extrato de UltraCal XS (1:8) produziram maiores níveis de IL-10 em macrófagos C57BL/6 quando comparadas aquelas com macrófagos BALB/c. As análises demonstraram expressivos níveis de ROS nas células tratadas com Zymozan A, utilizado como controle da reação. Não houve diferença na produção de ROS sob os diferentes tratamentos, nas duas linhagens celulares. Por sua vez, os macrófagos C57BL/6 produziram significativamente menores níveis de ROS quanto tratados com o BioC-Temp (1:8 e 1:12). A produção de NO foi significativamente maior nos macrófagos C57BL/6 que nos BALB/c, que também, quando tratados com Ultracal (1:12) e BioC-Temp (1:8 e 1:12) apresentaram maior atividade da arginase. Os dados foram analisados pelos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, e, subsequentemente, pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ou Anova Two-way, seguido do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Analisaram-se a resposta de cada subtipo de macrófago, o efeito da presença das medicações, como também das diversas situações apresentadas aos macrófagos (presença de leveduras e TNF- $\alpha$ ) em algumas situações experimentais, e a interação entre esses fatores. As análises foram feitas com o

software SPSS 18.0 Inc. (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, EUA). Conclui-se que o Ultracal XS não interferiu nas respostas de macrófagos enquanto o BioC-Temp, dependendo da concentração do extrato utilizado, interferiu negativamente na viabilidade celular e na produção de radicais de oxigênio (ROS). Novos estudos devem ser conduzidos para caracterizar os componentes envolvidos na interferências celulares promovidas pelo BioC-Temp.

**Palavras-chave:** Medicação intracanal. Biocerâmicos. BioC-Temp. Ultracal XS. Macrófagos. Citocinas. Radicais de oxigênio. Fagocitose.



## ABSTRACT

### **Bioceramic endodontic and calcium hydroxide dressings: effects on macrophage activity**

The mechanical-chemical preparation (PMQ) performed during endodontic treatment cannot wholly promote microbial clearance. It is imperative to place an intracanal medication in the treatment consultations. These medications must be biocompatible with the periradicular tissues with which they maintain direct contact. Several intracanal medication compositions have been developed to guarantee desirable antimicrobial properties and tissue biocompatibility. This study aimed to evaluate the effects of the intracanal medications Bio-C Temp (Angelus, Londrina, Paraná, Brazil) and Ultracal XS (Ultradent) on macrophage responses. It was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-UFMG: 2/2020). The experiments were carried out in the Gnotobiology and Immunology laboratory of the Institute of Biological Sciences (ICB) of the Federal University of Minas Gerais. Murine macrophages elicited from C57BL/6, and BALB/c mice were used. Cell viability, cell adhesion, phagocytosis, reactive oxygen species, nitric oxide, TNF- $\alpha$ , and IL-10 productions, and arginase activity were assayed in the presence and absence of drug extracts. Inflammatory macrophages were elicited from the animals' peritoneum after injection of sterile 3% Thioglycolate broth. After aspirating, the macrophages were centrifuged, and the final cell concentration was adjusted according to each proposed assay. Cell viability results showed no interference from Ultracal XS, in both cell lines, at different concentrations of extracts, by the two analysis methods. However, BioC-Temp, at a concentration of 1:4, induced a significant time-dependent reduction in cell viability by the MTT and Flow Cytometry method in both cell lines. The BioC-Temp and Ultracal XS extracts did not interfere in the capacity of cellular adhesion of macrophages BALB/c and C57BL/6, having, however, greater phagocytic capacity by macrophages C57BL/6 than BALB/c, in the presence or absence of the extracts of BioC-Temp and Ultracal XS. Higher production of TNF- $\alpha$  was seen by BALB/c macrophages than C57BL/6 when compared to unstimulated and stimulated cell cultures with Ultracal XS (1:8) and BioC-Temp (1:8). Only cultures treated with UltraCal XS extract (1:8) produced higher levels of IL-10 in C57BL/6 macrophages when compared to those with BALB/c macrophages. The analyses showed expressive ROS levels in the cells treated with Zymosan A, used as reaction control. There was no difference in the production of ROS under the different treatments in the two cell lines.

In turn, C57BL/6 macrophages produced significantly lower levels of ROS when treated with BioC-Temp (1:8 and 1:12). NO production was significantly higher in C57BL/6 macrophages than in BALB/c, which also when treated with Ultracal (1:12) and BioC-Temp (1:8 and 1:12) showed higher arginase activity. Data were analyzed by the Shapiro-Wilk and Levene tests and the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis or Two-way Anova tests, followed by the Tukey test ( $P < 0.05$ ). The response of each macrophage subtype, the effect of medications, the different situations presented to macrophages (presence of yeasts and TNF- $\alpha$ ) in some experimental situations, and the interaction between these factors was analyzed. Analyzes were performed using

SPSS 18.0 Inc software. (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA). It was concluded that Ultracal XS did not interfere with macrophage responses. In contrast, BioC-Temp, depending on the concentration of the extract used, interfered negatively with cell viability and the production of oxygen radicals (ROS). New studies should be conducted to characterize the components involved in cellular interference promoted by BioC-Temp.

**Keywords:** Intracanal medication. Bioceramics. BioC-Temp. Ultracal XS. Macrophages. Cytokines. Oxygen radicals. Phagocytosis.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Porcentagem de viabilidade de macrófagos C57BL/6 pelo ensaio do MTT na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12), nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

**Figura 2 -** Porcentagem de viabilidade de macrófagos Balb/c pelo ensaio do MTT na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12), nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

**Figura 3 -** Porcentagem de viabilidade de macrófagos C57BL/6 e Balb/c por análise de citometria de fluxo na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12) após 24 horas de incubação.

**Figura 4 -** Porcentagem de macrófagos C57BL/6 e Balb/c aderidos após incubação na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12), após 2 horas de incubação.

**Figura 5 -** Produção de TNF por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12) após 24 horas de incubação.

**Figura 6 -** Produção de IL-10 por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença e ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12) após 72 horas de incubação.

**Figura 7 -** Produção de radicais intermediários de oxigênio (ROS) por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12) e estimulado com zymosan.

**Figura 8** - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença e ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp ( 1:8; 1:12) e estimulado por IFN $\gamma$  +LPS.

**Figura 9** - Produção de Arginase por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença e ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12), após 48 horas de incubação.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: % de células fagocitadas por macrófagos C57BL/6 e Balb/c na presença dos extratos de Ultracal e BioC-Temp.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCT: Bio C Temp

Ca(OH)<sub>2</sub>: Hidróxido de Cálcio

IL-10 : Interleucina -10

IL-12: Interleucina -12

M1: Macrófago do Tipo 1

M2: Macrófago do Tipo 2

MTT: Método de Medida da Atividade da Desidrogenase Mitocondrial

NK: Natural Killer

NO: Óxido Nítrico

PBS: Salina Tamponada com Fosfato 0,01M pH 7,3

PMQ: Preparo Mecânico Químico

RANKL: Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

ROIs: Radicais Livres de Oxigênio

ROS: Radicais Livres Derivados do Oxigênio

SBF: Soro Bovino Fetal

SCR: Sistema de Canais Radiculares

SFT: Solução de Fosfato Tamponada

TiO<sub>2</sub>: Dióxido de Titânio

TNF: Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2	<b>ESTADO DA ARTE</b> .....	20
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	Objetivo geral .....	29
3.2	Objetivos específicos .....	29
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	30
4.1	Caracterização do estudo.....	30
4.2	Plano amostral.....	30
4.3	Preparo das medicações.....	31
4.4	Isolamento de macrófagos.....	31
4.5	Viabilidade celular.....	31
4.5.1	Viabilidade pelo ensaio de MTT.....	31
4.5.2	Viabilidade pela citometria de fluxo.....	32
4.6	Aderência celular.....	32
4.7	Ensaio de fagocitose da levedura <i>Saccharomyces Boulardii</i> .....	33
4.8	Detecção de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).....	33
4.9	Detecção de interleucina-10 (IL-10).....	34
4.10	Detecção de radicais livres de oxigênio.....	35
4.11	Detecção de óxido nítrico.....	36
4.12	Atividade de arginase.....	36
4.13	Análise estatística.....	37
5	<b>RESULTADOS</b> .....	38
5.1	Viabilidade celular.....	38
5.1.1	Viabilidade pelo ensaio do MTT.....	38
5.1.2	Viabilidade celular pela citometria de fluxo.....	40
5.2	Aderência celular.....	41
5.3	Ensaio de fagocitose da levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	42
5.4	Detecção de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) .....	43
5.5	Detecção de interleucina-10 (IL-10) .....	43
5.6	Detecção de radicais intermediários de oxigênio (ROS) .....	44
5.7	Detecção de óxido nítrico (NO).....	45
5.8	Atividade de arginase.....	46
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
7.	<b>CONCLUSSÃO</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

O preparo mecânico-químico realizado durante o tratamento endodôntico é incapaz de promover completamente a sanificação do SCR (sistema de canais radiculares) (HÜLSMANN *et al.*, 2005). Dessa forma, torna-se imperioso a utilização de uma medicação intracanal nas interconsultas do tratamento (LANA *et al.*, 2009). Essas medicações devem apresentar-se biocompatíveis aos tecidos perirradiculares, uma vez que permanecem em contato direto com o ligamento periodontal, cemento e, por vezes, com o tecido ósseo. Em contato com os tecidos, essas medicações poderão desencadear respostas imunoinflamatórias nos tecidos circunvizinhos, Langeland (1974), com ênfase na participação dos macrófagos, que são células prevalentes nas alterações perirradiculares (ORSTAVIK; MJÔR, 1992).

Ultimamente, os macrófagos foram divididos em dois subtipos: M1 e M2, de acordo com sua capacidade em produzir diferentes tipos de respostas (BASTOS *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2002; MILLS *et al.*, 2000; MOSSER 2003; REZENDE *et al.*, 2005). Macrófagos M1 diferenciados na presença de IL-12, e ativados por IFN- $\gamma$ , produzem óxido nítrico (NO) e intermediários do oxigênio (ROI) em resposta aos microrganismos (MOSSER 2003). O NO gera intermediários reativos do nitrogênio que causam danos às células e aos agentes infecciosos (NATHAN; SHILOH 2000). Os radicais intermediários do oxigênio (ROI) fazem-se representar pelo anion superóxido, peróxido de hidrogênio, e radicais hidroxila (NATHAN; SHILOH 2000). Por outro lado, os macrófagos M2 convertem, preferivelmente, a arginina em uréia e



ornitina, o que resulta na produção de colágeno e proliferação celular (BASTOS *et al.*, 2002; MILLS *et al.*, 2000; MOSSER 2003).

Nos anos recentes, várias composições de medicações intracanaís vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de garantir desejáveis propriedades antimicrobianas e, também, biocompatibilidade aos tecidos periapicais. O hidróxido de cálcio tem sido a medicação intra-canal de escolha devido a sua estabilidade química duradoura, elevada alcalinidade, ação bactericida provocada pela liberação de íons hidroxila, além de induzir a formação de tecido duro e atuar diretamente em exsudatos inflamatórios (KAWASHIMA *et al.*, 2009; MOHAMMADI; DUMMER, 2011). É utilizado também em procedimentos de apicificação Chala *et al.* (2001), além de atuar impedindo os processos de reabsorção óssea (HAMDAN *et al.*, 2017).

A Endodontia tem evoluído substancialmente, desenvolvendo e adotando novas tecnologias e materiais, que facilitam o trabalho do profissional e diminuem o tempo para execução do tratamento endodôntico (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008). Novas pastas à base de hidróxido de cálcio têm surgido no mercado com o objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas (como radiopacidade, facilidade de uso) e biológicas (indutora de reparo, anti-inflamatórias, anti-exsudativas, antimicrobianos dentre outras). Dentre estas, destaca-se a pasta UltraCal XS que, segundo seu fabricante, (ULTRADENT PRODUCTS, INC), apresenta boa viscosidade, e consequente bom escoamento, possibilitando o preenchimento metuculoso do canal radicular. Além disso, devido a sua baixa viscosidade, a pasta UltraCal XS pôde ser comercializada em uma seringa, passando facilmente pela agulha, o que tem facilitado a sua aplicação.

Com o advento da nanotecnologia, tornou-se possível o uso de biocerâmicos na prática endodôntica. Os biocerâmicos são compostos cerâmicos biocompatíveis obtidos por vários processos químicos. Exibem excelentes propriedades de biocompatibilidade devido à sua similaridade com a hidroxiapatita e à capacidade de induzir uma resposta regenerativa no corpo humano. Os biocerâmicos apresentam capacidade osteoindutiva intrínseca, pois absorvem substâncias osteoindutoras, que atuam no processo de cicatrização óssea (CHENG L *et al.*, 2010). Os cimentos biocerâmicos em endodontia são utilizados como material de reparação de perfurações radiculares e obturador de canal radicular devido às suas propriedades de biocompatibilidade, pH elevado, não reabsorção, facilidade de manuseio no interior dos canais radiculares, aumento da resistência radicular, baixa citotoxicidade, além de não sofrerem contração e serem quimicamente estáveis (NASSEH A *et al.*, 2009; CANDEIRO GT *et al.*, 201; KOCH K., 2009).

Recentemente, a indústria nacional disponibilizou a primeira pasta biocerâmica a ser utilizada como medicação intracanal, o Bio-C Temp (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil). Este material busca associar as propriedades bioativas dos cimentos biocerâmicos à medicação intracanal. A pasta contém em sua composição éster glicol salicilato, óxido de titânio, tungstato de cálcio, dióxido de silício, tolueno sulfonamida e silicato de cálcio, apresentando atividade antibacteriana devido à sua alta alcalinidade (pH: 12) (ANGELUS 2021).

Embora os materiais biocerâmicos apresentem resultados clínicos satisfatórios quando utilizados em cimentos endodônticos, ainda não existem estudos que avaliem a interação destes materiais com a resposta imune, principalmente em relação aos

macrófagos, que apresentam papel crucial na eliminação de patógenos e no processo de cicatrização.

## 2 ESTADO DA ARTE

As alterações pulpares e perirradiculares são normalmente o resultado do envolvimento direto ou indireto dos microrganismos presentes na cavidade oral (FABRICIUS *et al.*, 2006; KAKEHASI *et al.*, 1965; MOLLER *et al.*, 1966; SUNDQVIST, 1992;). Essas alterações inflamatórias geralmente surgem após a ação de mais diferentes agentes agressores físicos, químicos ou biológicos. Sua progressão é um fenômeno dinâmico, razão pela qual seus aspectos clínicos e morfológicos se modificam com o tempo (PEREIRA; BOGLIOLO, 1998).

Fisiologicamente, a inflamação é uma resposta do organismo frente a uma agressão (TROWBRIDGE; EMLING, 1996). É uma reação dos tecidos conjuntivos vascularizados, caracterizada morfológicamente pela saída de líquido e de células do sangue para o interstício. A maioria das inflamações agudas e crônicas se desenvolvem e se amplificam como resultado do recrutamento de componentes humorais e celulares (GALLIN, 1993).

Historicamente, imunidade significa proteção contra as doenças, tendo papel relevante nas doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune. Por sua vez, a resposta coordenada e coletiva à entrada de antígenos estranhos é a resposta imune. Porém, mecanismos que normalmente protegem os indivíduos de infecções e eliminam substâncias estranhas são capazes de causar lesão tecidual e doenças em algumas situações (ABBAS *et al.*, 2000).

A resposta imuno-inflamatória é um processo dinâmico, com a participação de vários tipos celulares, entre os quais neutrófilos, plasmócitos, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e linfócitos (TAKAHASHI, 1998). Cada uma dessas células apresenta numerosas funções. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem dos vasos sanguíneos. São fagócitos potentes que combatem infecções bacterianas e fúngicas. Geralmente se aderem às bactérias por meio de opsoninas, que desencadeiam a fagocitose e alterações metabólicas (aumento da glicólise e atividade respiratória). A degranulação dos neutrófilos e a liberação de produtos do ácido araquidônico são consequências advindas na sequência inflamatória. Esse processo é capaz de eliminar microrganismos, porém provoca danos teciduais decorrente das enzimas líticas e de radicais livres derivados do oxigênio (TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

Os macrófagos estão entre as primeiras células a entrar em contato com os corpos estranhos e têm importante papel na patogênese do processo imune. Eles produzem algumas citocinas que promovem a iniciação, perpetuação, direcionamento e inibição das respostas imunológicas (REZENDE *et al.*, 2005).

O sistema fagocitário mononuclear compreende um conjunto de macrófagos livres (circulantes, nos tecidos linfáticos e mielóide e nas cavidades naturais), e residentes, presentes nos tecidos. Ambos constituem populações bastante heterogêneas, mas com propriedades comuns que permitem a sua distinção (PEREIRA *et al.*, 1994).

As diferentes populações de macrófagos estão sujeitas a variações fenotípicas induzidas por sinais externos. Por essa razão, na mesma população pode-se ter macrófagos não ativados e macrófagos ativados. Quando estimulados, os macrófagos

deixam a circulação, guiados por um fator quimiotático, e se acumulam num determinado sitio infamatório (AABBAS *et al.*, 2000; JANEWAY *et al.*, 2002).

Os macrófagos ativados mudam suas características: aumentam o próprio tamanho, seu número de grânulos, quantidade de retículo granular, capacidade de espriar, de aderir ao substrato, de pinocitar, de digerir e de produzir óxido nítrico e radicais a partir do oxigênio. Essas modificações são muito bem evidenciadas, *in vitro*, mas, muitas delas são observadas, também, *in vivo*. A principal característica do macrófago ativado é o aumento da sua atividade microbicida e tumoricida (MOSSER, 2003; PEREIRA *et al.*, 1994).

A ativação consiste em alterações quantitativas na expressão de determinados produtos de genes, que permitem à célula executar funções adicionais. Citocinas, tais como IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-1, TNF, promovem a ativação dos macrófagos (ABBAS *et al.*, 2000). Por outro lado, citocinas, como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-13, têm a capacidade de inibir a ativação dos mesmos. A indução da ativação do macrófago é imunologicamente específica, enquanto sua expressão é inespecífica e consiste, em essência, numa capacidade antimicrobiana maior (STITES *et al.*, 1992).

Estudos evidenciaram que os macrófagos podem ser divididos em 2 tipos: M1 e M2, de acordo com sua habilidade em produzir diferentes tipos de resposta (MOSSER, 2003). A polarização M1/M2 é diferenciada pelos níveis constitutivos de IL-12 (BASTOS *et al.*, 2002; MOSSER, 2003). Os macrófagos de perfil M1 são aqueles ativados pela forma clássica, na presença da IL-12. Em função disso, esses macrófagos aumentam sua produção de óxido nítrico e radicais reativos de oxigênio, na tentativa de eliminar os microrganismos (MOSSER, 2003). Os macrófagos de perfil

M2 foram inicialmente identificados durante o exame de células em que a transcrição de IL-12 foi abolida. Para serem ativados, eles precisam de dois sinais: a ligação com o receptor FcγRs e a ligação com o receptor do tipo toll, ou CD40, ou CD44 (BASTOS *et al.*, 2002). Os macrófagos M2 promovem a conversão da arginase em ornitina, apresentando como produto final o colágeno e proliferação celular (MILLIS *et al.*, 2000; MOSSER, 2003). Estas células até produzem pequenas quantidades de NO e ROI, porém, as altas concentrações de IL-10 e TGF-β inibem a síntese de altos níveis desses componentes. Com exceção da IL-10 e da IL-12, a produção das demais citocinas ocorre de forma semelhante àquela observada nos macrófagos do tipo M1. O nome, macrófagos ativados do tipo II, deriva de sua habilidade em, preferencialmente, induzir resposta imune adaptativa do tipo 2 (MOSSER, 2003).

As citocinas são proteínas secretadas por diferentes tipos celulares, dentre elas as células da imunidade inata e adaptativa e medeiam muitas das funções dessas células. São produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos. Diferentes citocinas estimulam diversas respostas das células envolvidas na imunidade e na inflamação. Na fase ativa da resposta imune, citocinas estimulam o crescimento e diferenciação dos linfócitos, e nas fases efectoras da imunidade inata e adaptativa, elas ativam diferentes células para eliminar microrganismos e outros antígenos (ABBAS, *et al.* 2000). Suas funções são frequentemente redundantes e influenciam na síntese e ação de outras citocinas (AABBAS *et al.*, 2000). Agem por mecanismo autócrino, parácrino e, às vezes, endócrino (PEREIRA, *et al.* 1994).

Quando da instituição da terapia endodôntica, uma de suas etapas compreende a utilização de uma medicação intra-canal que ocorre após os procedimentos de limpeza e formatação dos SCR. Por anos, o hidróxido de cálcio vem sendo a

medicação de escolha. Os primeiros relatos da utilização do hidróxido de cálcio (HC) na odontologia são atribuídos a Nygren (1838), no tratamento da fístula dental. Codman (1851) relatou o seu uso em amputações radiculares de dentes com vitalidade pulpar. Entretanto, o hidróxido de cálcio só foi introduzido na endodontia, baseando-se em evidências científicas, em 1920 por Hermann (SIQUEIRA JR., 1999). Inicialmente fora indicado como material obturador. Contudo, suas propriedades antimicrobianas e sua capacidade de indução de deposição de tecido mineralizado o credenciaram como auxiliar no tratamento endodôntico em múltiplas sessões (KIM *et al.*, 2014).

Seus efeitos antimicrobianos foram, ao longo dos anos muito estudados (BYSTROM *et al.*, 1985; ESTRELA *et al.*, 2001; ESTRELA *et al.*, 2003; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2012; GUERREIRO J *et al.*, 2021; KIM; KIM 2014; MOHAMMADI; DUMMER, 2011; TAVARES *et al.*, 2012). Sua eficácia antimicrobiana é imputada à liberação de íons hidroxila, que reagem com várias biomoléculas causando danos à membrana citoplasmática e a desnaturação proteica dos microrganismos (MOHAMMADI; DUMMER, 2011). Ademais, seu pH elevado torna o meio inóspito para o crescimento microbiano (KIM; KIM, 2014). Segundo Leonardo *et al.* (2004), o HC é o único medicamento intracanal capaz de inativar os efeitos tóxicos da endotoxina bacteriana, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A endotoxina bacteriana, ou LPS, é um componente da parede de bactérias gram negativas e está presente em todos os canais radiculares infectados (TANOMARU *et al.*, 2003).

Embora estudos *in vivo* tenham investigado a propriedade antibacteriana do hidróxido de cálcio (BRYSTOM A *et al.*, 1985; BLANSCET *et al.*, 2008; ESTRELA *et al.*, 1995; ESTRELA *et al.*, 1999; ESTRELA *et al.*, 2003; FAVA LR *et al.*, 1999; LANA



PE, 2009), seus efeitos na resposta imune periapical foram pouco explorados (KHAN AA *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2012). Tavares *et al* (2012) avaliaram os efeitos do hidróxido de cálcio sobre a resposta imunoinflamatória nos tecidos periapicais, determinando sua influência no líquido intersticial periapical de canais radiculares humanos. Para tal, dosaram os níveis de expressão de mRNA das citocinas interferon (IFN)-g, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , interleucina (IL)-1b, IL-17A e IL-10, bem como a quimiocina MCP-1, após o preparo químico-mecânico e 15 dias após. Observaram que os níveis de IL-1b, IFN-g, IL-10 e de CCL2/MCP-1 estavam aumentados em dentes que não receberam a medicação intra-canal a base de  $\text{Ca(OH)}_2$ , enquanto que no grupo que a recebeu não se observou alterações estatisticamente significativas na expressão dessas citocinas. Ao se comparar o grupo que recebeu a medicação intra-canal com aquele que não a recebeu, observou-se diferença estatisticamente significativa entre eles quanto a expressão de IL-1b, IFN-g e IL-10, que apresentou níveis menores no grupo com a medicação. Estes autores demonstraram que a medicação intra-canal a base de  $\text{Ca(OH)}_2$  impediu o aumento da expressão dos mediadores avaliados durante os tempo experimentais.

A medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio é ainda hoje a mais utilizada. Por sua vez, novas pastas têm surgido no mercado com o objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas (como radiopacidade, facilidade de uso) e biológicas (indutora de reparo, anti-inflamatórias, anti-exudativas, antimicrobianos, dentre outras). Atualmente, destaca-se a pasta UltraCal XS (ULTRADENTE Products, INC) que, segundo seu fabricante, apresenta boa viscosidade, possibilitando preencher meticulosamente o canal radicular. O Ultracal®XS é uma pasta pronta para uso que apresenta na sua composição 35% de  $\text{Ca(OH)}_2$ , 2% de sulfato de bário, água e metil

celulose. Devido a sua baixa viscosidade pôde ser comercializada em uma seringa, passando facilmente pela agulha, o que tem facilitado a sua aplicação.

Há pouco os materiais endodônticos biocerâmicos, à base de silicatos e/ou fosfato de cálcio, atraíram considerável atenção, apresentando excelentes propriedades físico-químicas e biológicas (AL-HADDAD; AZIZ, 2016). Possuem pH alcalino e atividade antibacteriana, sendo quimicamente estáveis em um ambiente biológico (CANDEIRO, *et al.*, 2012; SIMUNDI' C MUNTI' C, *et al.*, 2019). A sua composição inclui silicatos tricálcicos e dicálcicos, fosfatos de cálcio, hidróxido de cálcio e óxido de zircônio como um radiopacificador (BUENO CR *et al.*, 2016).

Os materiais biocerâmicos são compostos cerâmicos biocompatíveis obtidos por vários processos químicos. Exibem excelentes propriedades de biocompatibilidade devido à capacidade de induzir o processo biológico de formação da hidroxiapatita e uma resposta regenerativa no corpo humano. Esses materiais apresentam capacidade osteoindutiva intrínseca, pois absorvem substâncias osteoindutoras durante o processo de cicatrização óssea (CHENG L *et al.*, 2010).

Estudos laboratoriais relatam que os materiais biocerâmicos apresentam vários graus de atividade antimicrobiana, impossibilitando qualquer conclusão sobre sua eficácia antimicrobiana (SIMUNDI C MUNITI C *et al.*, 2019). Por outro lado, autores relatam também que os cimentos obturadores biocerâmicos têm demonstrado poder antimicrobiano satisfatório e baixa citotoxicidade (AL ANEZI *et al.*, 2010). A baixa atividade antibacteriana do Bio-C Temp pode ser atribuída a uma menor quantidade de formação de moléculas de HC durante a reação de hidratação, quando comparadas àquelas obtidas com a utilização do Calen" e UltraCal" XS (GUERREIRO *et al.*, 2021). Sabe-se que os materiais a base de silicatos de cálcio, quando

hidratados, formam o hidróxido de cálcio que se dissocia rapidamente em íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{OH}^-$ , aumentando o pH do meio (CAMILLERI 2011; VILLA, *et al.*, 2020).

O crescente interesse pelos materiais biocerâmicos é evidenciado pelo desenvolvimento de novos medicamentos bioativos à base de silicato de cálcio, a Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brasil) desenvolveu um medicamento intracanal biocerâmico, Bio-C Temp, pronto para uso. O Bio-C Temp é indicado como curativo intracanal para tratamento endodôntico ou retratamento, pulpotomia e tratamento de dentes permanentes imaturos para induzir a apicificação (GUERREIRO JC *et al.*, 202; VILLA N *et al.*, 2020). Segundo o fabricante, o Bio-C Temp contém silicatos de cálcio associados a radiopacificadores de tungstato de cálcio e óxido de titânio, além de aluminato de cálcio, óxido de cálcio e resina base (ANGELUS 2021).

Segundo Guerreiro *et al.* (2021), ao analisar as propriedades antimicrobianas e biológicas de um novo medicamento intracanal biocerâmico, o Bio-C Temp, e compará-lo com dois outros medicamentos intracanaís à base de hidróxido de cálcio, o Calen" e o Ultra-Cal" XS, viu-se que o Bio-C Temp induziu maior atividade da fosfatase alcalina (APC) e a deposição de nódulos de cálcio. No entanto, vale ressaltar que o Bio-C Temp apresentou menor capacidade em formar nódulos e ativar a APC do que o Calen". Tal achado pode se dever à composição do material e às diferentes vias de indução de mineralização.

Oliveira *et al.* (2021) analisaram a descoloração, radiopacidade, pH e liberação de íons cálcio pelo Bio-C temp (BCT), bem como os seus efeitos biológicos sobre as células da polpa dental humana. Neste último aspecto, viu-se que o BCT induziu uma menor porcentagem de viabilidade celular que a cultura controle sem estímulo. Isso

pode se dever ao tamanho das partículas e a da bioatividade do BCT que podem interferir na arquitetura celular, levando a diferentes respostas celulares (KILNGSHOTT *et al.*, 2011). Ademais, a presença de TiO<sub>2</sub> (dióxido de titânio) em sua composição pode ser o fator que reduz a viabilidade, uma vez que o mesmo interfere em vários eventos celulares, tais como a ativação da via da proteína quinase por mitógeno, com conseqüente redução da sobrevivência celular (YU *et al.*, 2019). Em adição, o TiO<sub>2</sub> induz a apoptose celular, demonstrado em estudos utilizando macrófagos e monócitos murinos (DHUPHAL *et al.*, 2018), linfócitos (WANG *et al.*, 2007), fibroblastos (JIN *et al.*, 2008) e células-tronco mesenquimais (YU *et al.*, 2019).

De todo o exposto, torna-se relevante analisar as respostas de macrófagos ao Bio-C Temp em comparação à ação do hidróxido de cálcio (Ultracall - Ultradent), visto que sua citotoxicidade não foi ainda avaliada frente a estas células.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais:

Avaliar as respostas de macrófagos frente aos estímulos promovidos pelas medicações Bio C Temp (Ângelus) e Ultracal (Ultradent).

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a **viabilidade celular** de macrófagos BALB/C e C57BL/6, elicitados de camundongos C57Bl6 e BALB/c, respectivamente, em contato com as medicações Ultracall XS (Ultradent) e Bio C Temp (Ângelus) em diferentes concentrações;
- Avaliar **viabilidade celular** de macrófagos BALB/C e C57BL/6, em contato com as medicações intracanal Ultracall XS (Ultradent) e Bio C Temp (Ângelus), utilizando o ensaio de **citometria de fluxo**.
- Avaliar a capacidade de **aderência dos macrófagos** BALB/C e C57BL/6, em contato com as medicações Ultracall XS (Ultradent) e Bio C Temp (Ângelus);
- Avaliar a **capacidade fagocítica dos macrófagos** BALB/C e C57BL/6, em contato com as medicações Ultracall XS (Ultradent) e Bio C Temp (Ângelus);
- Avaliar a **produção de citocinas** pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , e reguladora, IL-10, por macrófagos BALB/C e C57BL/6, em contato com as medicações Ultracall XS (Ultradent) e Bio C Temp (Ângelus);
- Avaliar a produção de radicais livres de oxigênio (**ROS**) e óxido nítrico (**NO**) pelos macrófagos BALB/C e C57BL/6, após contato com as medicações Ultracall XS (Ultradent) e Bio C Temp (Ângelus);
- Avaliar a atividade da arginase pelos macrófagos BALB/C e C57BL/6, após contato com as medicações Ultracall XS (Ultradent) e Bio C Temp (Ângelus).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Caracterização do estudo

Este estudo avaliou a atividade de macrófagos inflamatórios elicitados de duas linhagens de camundongos: C57BL/6 e BALB/c. Foram observados a viabilidade e a capacidade de aderência celular, a fagocitose de *Saccharomyces boulardii*, e a produção de TNF, IL-12, IL-10, ROI e NO, na presença e na ausência das medicações UltraCal XS e Bio-C Temp. O projeto de pesquisa foi aprovado ao Comitê de ética e pesquisa em animais (CEUA UFMG: 2/2020).

### 4.2 Plano amostral

Constituíram-se três grupos:

- grupo I - extratos de UltraCal<sup>®</sup> XS (Ultradent do Brasil Produtos Odontológicos Ltda, Indaiatuba, São Paulo) diluídos nas concentrações 1:4; 1:8; 1:12.
- grupo II – extratos de Bio-C TEMP (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil); ) diluídos nas concentrações 1:4; 1:8; 1:12.
- grupo III – sem estímulo (controle).

### 4.3 Preparo das medicações

Uma alíquota de 100 mg de cada medicamento foi colocada em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, 1,2 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado aos microtubos, que permaneceram em incubadora à 37 C por 24 h. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos e centrifugado por 10 min a 20.800 g (5430; Eppendorf AG) para decantar possíveis partículas que permaneceram no sobrenadante (Faria *et al.* 2018). O sobrenadante foi transferido para novos microtubos, diluindo-o (1:2, 1:8 e 1:12) e colocando-o em contato com os macrófagos peritoneais. Os ensaios foram realizados conforme metodologia proposta por Ochoa-Rodriguez *et al.* (2019).

#### 4.4 Isolamento de macrófagos

As células foram isoladas da cavidade peritoneal de 12 camundongos C57BL/6 (macrófagos M1) e 12 BALB/c (macrófagos M2) 5 dias após a injeção peritoneal de 2 mL de meio de tioglicolato a 3% (Biorbra s S.A., Montes Claros, MG, Brasil). Os camundongos foram mortos por decapitação e exsanguinados. Imediatamente após, injetaram-se 10 mL de meio RPMI estéril (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) nas cavidades peritoneais dos animais, utilizando-se uma seringa e uma agulha de calibre 18. As células foram recuperadas da cavidade peritoneal por aspiração do meio contendo as células inflamatórias. Mais de 90% das células recuperadas apresentavam características morfológicas de macrófagos quando visualizadas por microscopia óptica. As células foram ressuspensas em meio completo: RPMI 1640 (Sigma Chemicals Co.), suplementado com 10% de soro fetal de vitela (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), 0,1% de 0,05 mol L<sup>-1</sup> b-mercaptoetanol (Sigma Chemicals Co.), penicilina 0,2% (100 U mL<sup>-1</sup>)/estreptomicina (0,1 mg mL<sup>-1</sup>) e 200 m mol L<sup>-1</sup> L-glutamina (MENDES et al. 2003). Os ensaios foram realizados cultivando as células em placas de cultura de 24 ou 96 poços, mantidas em uma incubadora por 24 h para que as células ali aderissem. As culturas foram incubadas com os medicamentos por períodos de 24, 48 e 72h. O meio de cultura DMEM foi utilizado como controle (células não expostas) (MENDES *et al.*, 2003).

#### 4.5 Viabilidade Celular

##### 4.5.1 Viabilidade pelo ensaio do MTT

Realizaram-se culturas celulares contendo  $1 \times 10^6$  células/mL em placas de cultura de 96 poços por 24, 48 e 72 h, em 100  $\mu$ L de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina a 37°C. Foram acrescentados ou não (grupo controle) 200  $\mu$ L de extratos das medicações UltraCal Xs, Bio-C, diluídas 1:4, 1:8 e 1:12, em um volume total de 300  $\mu$ L. As placas foram mantidas por 24 hs, em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, quando se

determinou a viabilidade celular utilizando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT - Sigma-Aldrich) (van de Loosdrecht et al. 1991).

#### 4.5.2 Viabilidade celular pela citometria de fluxo

Às culturas celulares contendo  $1 \times 10^6$  células/mL, crescidas em placas de 96 poços (Nunclon<sup>TM</sup>, Nalge Nunc International), foram adicionadas diluições seriadas das medicações UltraCal Xs e Bio-C e mantidas por 24 hs em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A cultura controle foi tratada com DMEM. Subsequentemente, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e mantidas por 15 minutos no gelo, quando se utilizou o kit para avaliação celular LIVE/DEAD<sup>TM</sup> (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Cada uma das amostras foi analisada em tubo de poliestireno transparente, no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, USA), utilizando o filtro 530/30, e o laser Diodo 633nm. Como padrão foram lidos 20.000 eventos. Após a leitura, os resultados foram analisados no software FlowJo 10.1 (Tree Star Inc., EUA).

#### 4.6 Aderência celular

A análise da aderência de macrófagos ao substrato foi realizada conforme descrito por Lee *et al.* (1993), com pequenas modificações. Foram utilizados tubos de propileno estéreis (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra), nos quais foram adicionados suspensões celulares contendo  $1 \times 10^6$  células/mL em meio completo na presença ou ausência das diluições seriadas dos extratos de UltraCal Xs e Bio-C. Após 2 horas de incubação em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, os tubos foram vortexados, por 5 segundos, em baixa velocidade. Após a homogeneização, alíquotas de 20 µL de cada amostra foram removidas, colocadas em câmaras de Newbauer, armazenadas em placas de petri umidificadas e, novamente incubadas a 37°C, por uma hora. Em seguida realizou-se a contagem por microscopia óptica dos macrófagos aderentes e dos não aderentes. O cálculo da porcentagem de



aderência foi realizado dividindo-se o número de macrófagos aderidos pelo o número total de células e multiplicado por 100.

#### 4.7 Ensaio de fagocitose da levedura *Saccharomyces boulardii*

Para se verificar a interferência de UltraCal XS e Bio-C Temp no processo de fagocitose dos macrófagos M1 e M2, utilizou-se a técnica descrita por Giaimis et al. (1992), com algumas modificações. Lamínulas redondas estéreis (GlassTécnica, GlassTécnica Importação e Comércio de Vidros, São Paulo, SP, Brasil) foram mantidas nos poços de uma placa de cultura de 24 poços (Nunclon™, Nalge Nunc International). Sobre essas lamínulas se adicionou  $5 \times 10^5$  células/mL em meio completo, e as placas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, por 2 horas. Após esse período de incubação, o meio foi removido e descartado, as células foram lavadas uma vez com RPMI 1640, sem fenol vermelho, a 37°C, quando se acrescentou 1 mL de RPMI 1640 sem fenol vermelho aos poços, a 37°C. Em seguida, se adicionou 10µL da suspensão de *S. boulardii* ( $10^7$  UFC/mL) (Floratil; Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), incubando-se as placas por 1h, em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

As leveduras não ligadas foram removidas por lavagem com meio completo e, a seguir, as lamínulas foram cobertas, por 1 minuto, com 1 mL de ácido tânico a 1% (Merk, Billerica, MA, EUA) para que se distinguisse as leveduras extra e intracelulares. Uma gota de soro fetal foi aplicada em cada lamínula. As lamínulas secas foram coradas com Panotico R apido (Laborclin Ltd, Pinhais, PR, Brasil) e coladas em lâminas de vidro com Entellan (Merk) para observação em microscópio óptico em imersão (1000 X) (21). As células foram contadas até que 200 macrófagos com levedura fagocitada fossem detectados. Os resultados foram expressos em porcentagem.

#### 4.8 Detecção de fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ )

Foram colocadas em placas de 24 poços (Nunclon™, Nalge Nunc International), 1 mL de suspensão celular contendo  $2 \times 10^6$  células/mL, com e sem  $10 \text{ U}^1/\text{mL}$  de TNF- $\alpha$  recombinante (Pharmingem, San Diego, CA., EUA), na presença ou ausência das diluições seriadas dos extratos das medicações (1:4, 1:8, 1:12). Em

seguida, as placas foram incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C. O sobrenadante da cultura foi recolhido e a leitura foi realizada utilizando-se os kits Duo Set Elisa TNF (development System R&D Systems, Mineapolis, MN, EUA). A detecção foi realizada de acordo com o fabricante: 100µL de anticorpo de captura (144µg/mL), utilizado como revestimento das placas de ELISA (Falcon, Becton Dickinson); tampão de revestimento (8,4mg/mL de NaHCO<sub>3</sub>, 5,8 mg/mL NaCl em pH 9,6) na concentração de 0,8µg/mL; e, incubação das placas por 24 horas, à 4°C. Em seguida, a reação foi bloqueada com 200µL de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co) em PBS, por 1 hora, à temperatura ambiente; 5 lavagens foram realizadas com PBS-Tween 0,1% (Sigma Chemical Co). Colocou-se o padrão de TNF-α nos dois primeiros poços (concentração de 1000pg/mL) e, nos poços seguintes, realizaram-se diluições sucessivas de 1:2. Na sequência, acrescentaram-se 100µL dos sobrenadantes e 100µL de albumina bovina a 1% em PBS, nos poços em branco. Após 18-24 horas de incubação, à 4°C, as placas foram novamente lavadas, durante cinco vezes, e 100µL do anticorpo de detecção (54µL/mL), em 1% BSA (Sigma Chemical Co.) em PBS-Tween 0,1% foi colocado em cada poço, e mantido por 2 horas, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 0,1% e 100µL de 0,5% de estreptavidina conjugada com peroxidase, em albumina bovina a 1%, foi adicionado em cada poço. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 0,1% e adicionado, a cada poço, 100µL de solução de substrato, 0,5mg/mL de ABTS (ácido azinobistiozonilio sulfônico) (Sigma Chemical Co.) em tampão citrato/fosfato (17,8g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O e 21,01 g/l C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O em pH 4,0), contendo 1µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 30 minutos, interrompeu-se a reação com 30µL/poço de SDS 1%, quando se realizou a leitura no espectrofotômetro (Bio-Rad, 2550, Hercules, EUA), em um comprimento de onda de 405 nm e sensibilidade de 31,2 pg/mL.

#### 4.9 Detecção de interleucina-10 (IL-10)

Detectou-se a produção de IL-10 de forma semelhante às outras citocinas. O sobrenadante foi recolhido após 72 horas de incubação, quando se realizou a leitura, utilizando-se os kits Duo Set Elisa IL -10 (Development System R&D Systems).

Utilizou-se 100µL/poço de anticorpo de captura (360µg/mL), como revestimento das placas de ELISA (Falcon, Becton Dickinson) na concentração de 2µg/mL em tampão de revestimento (pH 9,6). As placas foram, então, incubadas por 24 horas à 4°C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com 200µL de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) em PBS, por 1 hora, à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 0,1% (Sigma Chemical Co). Colocou-se o padrão de IL-10 nos dois primeiros poços, estando eles a uma concentração de 2000 pg/mL. Nos poços seguintes, realizou-se diluições sucessivas de 1:2. Em seguida, acrescentou-se 100µL/poço dos sobrenadantes e 100µL/poço de albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.), nos poços em branco. Após 18-24 horas de incubação à 4°C, as placas foram novamente lavadas cinco vezes e 100µL/poço do anticorpo de detecção (72µL/mL) em albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.) foi acrescentado, mantendo-se a placa por 2 horas, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 1%, quando se adicionou 100µL/poço de 0,5% de estreptavidina conjugada com peroxidase em albumina bovina a 1% (Sigma Chemical Co.). Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 0,1%. Adicionou-se 100µL/poço de solução de substrato, 0,5mg/mL de ABTS (Sigma Chemical Co.) em tampão citrato/fosfato pH 4,0, contendo 1µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 30 minutos, essa reação foi interrompida, utilizando-se 30µL de SDS à 1%, quando se fez a leitura em espectrofotômetro (Bio-Rad, 2550, Hercules, EUA), em um comprimento de onda de 405nm e sensibilidade 15,6pg/mL.

#### 4.10 Detecção de radicais intermediários de oxigênio (ROI)

A suspensão celular contendo com  $1 \times 10^6$  células/mL foi incubada por 24 horas na presença ou ausência das diluições dos extratos das medicações (1:4, 1:8, 1:12), em tubos de polipropileno estéreis, em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após o período de incubação, os tubos de polipropileno foram centrifugados a 350xg, por 10 minutos, à 4°C. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 100µL de RPMI 1640 sem o fenol vermelho (Sigma Chemical Co.) em cada tubo de polipropileno. Todo esse conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços, contendo 70µL de RPMI 1640 sem o fenol vermelho (Sigma Chemical Co.). No momento da leitura da placa foram adicionadas

$10^7$  partículas de zymosan/mL e 10  $\mu$ L de luminol, diluído 1:10 em RPMI 1640 sem o fenol vermelho; a solução de stock do luminol foi realizada pela dissolução de 1,77mg dele em 1mL de dimetil sulfóxido (DMSO). A placa foi levada ao Lumicount™ (Packard Bioscience Company) (TRUSK, WILSON e VAN DYKE, 1978).

#### 4.11 Detecção de óxido nítrico (NO)

A detecção da produção de NO foi semelhante àquela descrita para a dosagem de IL-10. Após a incubação das placas contendo as culturas celulares, recolheu-se o sobrenadante e procedeu-se como se segue: 50 $\mu$ L foram colocados em placas de 96 poços (Corning, NY, EUA), acrescidos de 50 $\mu$ L de RPMI 1640 sem o fenol vermelho (Sigma Chemical Co.) nos poços em branco e nos poços da curva padrão. Em seguida, acrescentou-se 100 $\mu$ L de solução estoque de NaNO<sub>2</sub> a 100  $\mu$ M, previamente diluídos 1:200, nos primeiros poços da curva padrão. Realizaram-se diluições sucessivas de 1:2 nos poços seguintes. Por fim, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de uma mistura de sulfanilida a 1% em ácido fosfórico 2,5%, e naitiletilenodiamida 1%, em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, realizou-se a leitura em leitor de ELISA (Bio-Rad 2550, Hercules, EUA), a 540nm. A quantidade de nitrito foi calculada utilizando-se uma curva padrão de nitrito de sódio (125 $\mu$ M a 0,977 $\mu$ M). Sensibilidade: 0,5 $\mu$ M (GREEN *et al.*, 1982).

#### 4.12 Atividade da arginase

As células foram cultivadas em tubos de polipropileno, na presença ou ausência dos substratos de UltraCal XS e Bio-C Temp, em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, por 48 horas. A atividade da arginase foi mensurada em lisatos das células como descrito por Corralisa *et al.* (1994). Em resumo, as células foram lisadas com 50  $\mu$ l de 0,1% de Triton X-100 (Sigma Chemicals Co.). Após 30 minutos sob agitação, 50  $\mu$ l de 10 mmol L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub> (Merck), 50  $\mu$ l de mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCL (Merck) foram adicionados e a enzima foi ativada por aquecimento por 10 min à 55 °C. A hidrolise da arginina foi conduzida pela incubação de 25  $\mu$ l do lisato ativado com 25  $\mu$ l de 0,5 mol L<sup>-1</sup> de l-arginina (Merck; pH 9.7), a 37 °C por 60 min. A reação foi paralisada com 400  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%)/

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)/H<sub>2</sub>O (1/3/7/v/v/v). Como grau de atividade da arginase, a concentração de ureia foi medida a 540 nm após a adição de 25 µl de α-isonitrosopropiofenol (Sigma Chemical Co.) dissolvido em etanol 100%, por 45 min a 95 °C. Uma unidade de atividade da arginase foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 µmol de urea por min<sup>-1</sup>. A curva padrão foi preparada aumentando as quantidades de ureia entre 1,625 a 100 µg.

#### 4.13 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene), e analisados em seguida pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ou Anova Two-way, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas de médias ( $P < 0,05$ ). Analisaram-se: a resposta de cada subtipo de macrófago, o efeito da presença das medicações, como também das diversas situações apresentadas aos macrófagos (presença de leveduras e TNF-α) em algumas situações experimentais, e a interação entre esses fatores. As análises foram feitas com o software SPSS 18.0 Inc. (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, EUA).

## 5 RESULTADOS

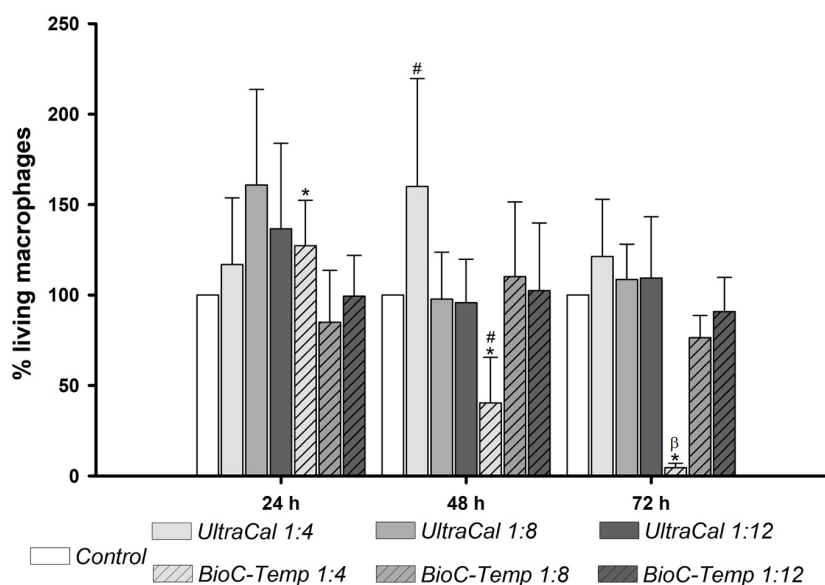
### 5.1 Viabilidade celular

#### 5.1.1 Viabilidade pelo ensaio do MTT

A viabilidade de macrófagos C57BL/6 pelo método do MTT (FIGURA 1) demonstra que não houve diferenças significativas entre os tratamentos realizados com o Ultracal XS, nos diferentes tempos analisados. O BioC-Temp, na concentração de 1:4, induziu uma redução significativa na viabilidade celular tempo dependente ( $P < 0.05$ ). Viu-se que, com 48 hs, a viabilidade das culturas tratadas como Ultracal XS (1:4) foi significativamente maior que aquela tratada com o BioC-Temp (1:4) ( $P < 0.05$ ). A 72 hs, o BioC-Temp reduziu significativamente a viabilidade celular em relação a todos os outros tratamentos ( $P < 0.05$ ).

A Figura 1 mostra a porcentagem de viabilidade de macrófagos C57BL/6 pelo ensaio do MTT na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As barras representam a média de 2 experimentos realizados em duplicata e as linhas representam os desvios padrão das medias. (\*, #) indicam diferenças estatísticas em relação ao mesmo tratamento, enquanto ( $\beta$ ) indica diferença estatística entre os demais tratamentos, à 72 hs. ( $P < 0,05$  pelo teste de Kruskal–Wallis).

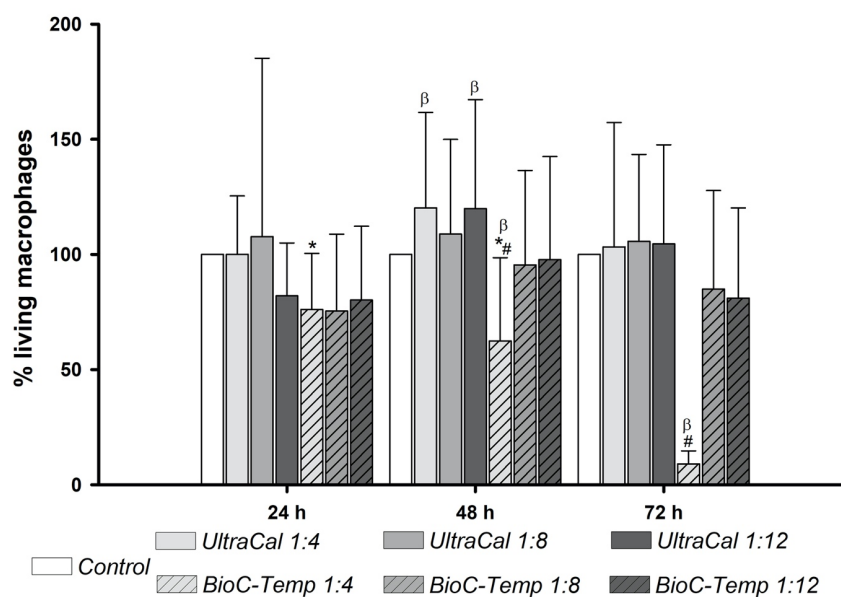
Figura 1- Porcentagem de viabilidade de macrófagos C57BL/6 pelo ensaio do MTT na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12), nos tempos de 24, 48 e 72 horas.



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

A Figura 2 demonstra a viabilidade de macrófagos BALB/c na presença e na ausência dos extratos de Ultracal XS e BioC-Temp. Observa-se que não houve diferença significativa na viabilidade celular nos três tempos analisados, nas diferentes concentrações dos extratos de Ultracal XS. Em relação ao período de 48 horas, a diluição de BioCTemp (1:4) promoveu menores valores de viabilidade quando comparado ao UltraCal XS 1:4 ( $p=0,017$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos testados e o grupo controle ( $p>0,05$ ). O BioC-Temp (1:4) induziu, à 72 hs, uma redução significativa da viabilidade celular observada em 24 e 48 horas ( $p<0,05$ ). Ao se comparar este achado (BioC-Temp - 1:4, às 72 hs) aos demais tratamentos, viu-se que esta foi a menor porcentagem de viabilidade celular ( $p<0,05$ ).

Figura 2 - Porcentagem de viabilidade de macrófagos Balb/c pelo ensaio do MTT na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12), nos tempos de 24, 48 e 72 horas.



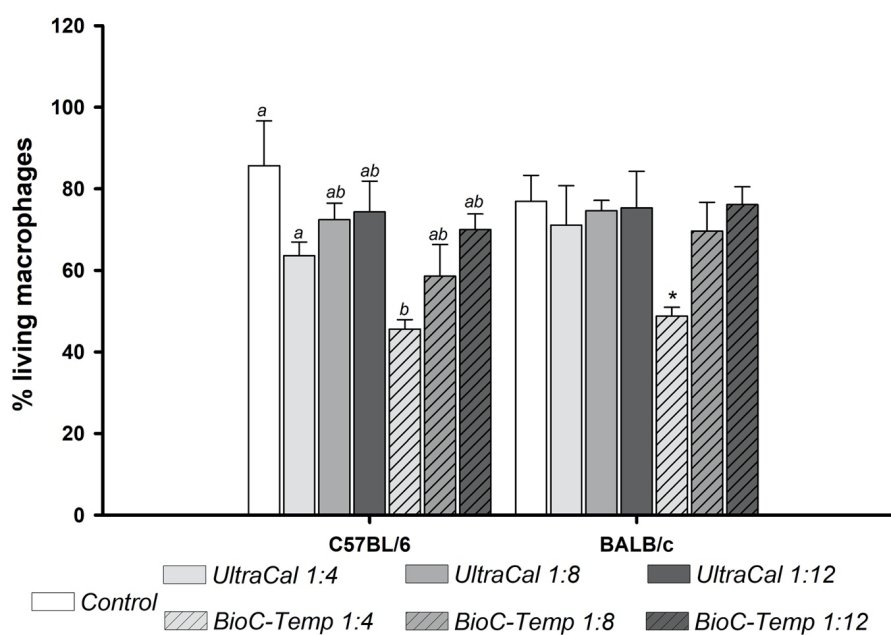
Fonte: elaborada pelo autor (2022).

### 5.1.2 Viabilidade Celular pela Citometria de Fluxo

A Figura 3 representa a viabilidade celular das culturas de macrófagos BALB/c e C57BL/6 tratadas com os diferentes extratos de Ultracal XS e BioC-Temp e analisadas por citometria de fluxo. Vê-se que não houve diferença significativa na viabilidade celular das culturas de C57BL/6 tratadas com os extratos de Ultracal XS. Observa-se, contudo, que o extrato do BioC-Temp (1:4) reduziu significativamente a viabilidade dos macrófagos C57BL/6 quando comparadas ao controle e ao extrato de Ultracal XS (1:4). Nas culturas de macrófagos BALB/c apenas os extratos de BioC-Temp (1:4) reduziram significativamente a viabilidade celular quando comparado ao controle e aos demais extratos de BioC-Temp e Ultracal XS. Não houve diferença significativa na viabilidade celular quando se comparou os dois tipos de macrófagos.

**FIGURA 3** - Porcentagem de viabilidade de macrófagos C57BL/6 e Balb/c por análise de citometria de fluxo na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12) após 24 horas de incubação. Fonte: elaborada pelo autor (2022).



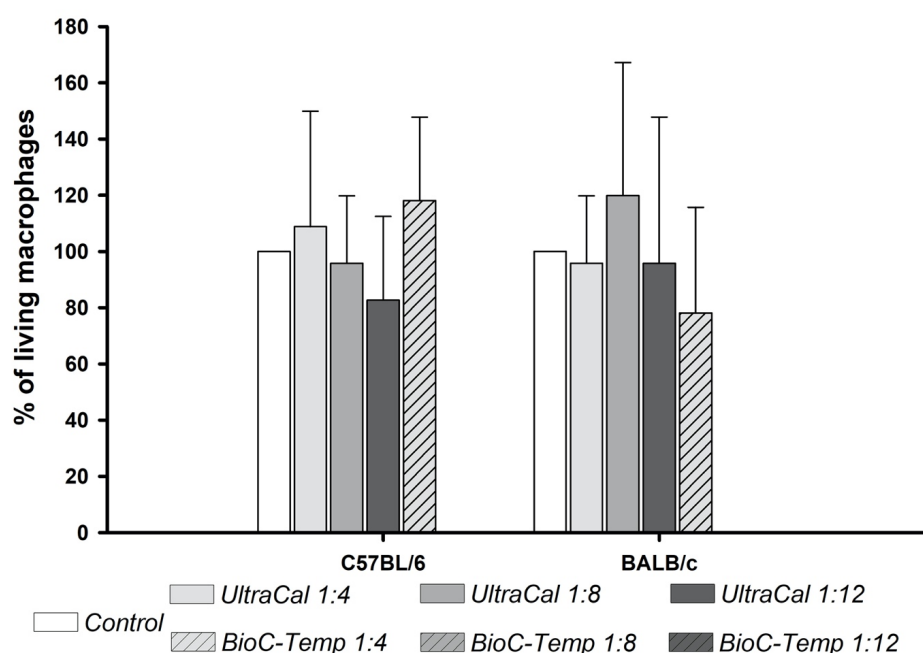


Fonte: elaborada pelo autor (2022).

## 5.2 Aderência Celular

A Figura 4 demonstra a porcentagem de macrófagos C57BL/6 e BALB/c quando tratados com as diferentes concentrações dos extratos de Ultracal XS e BioC-Temp (1:4, 1:8, 1:12). Não houve diferença significativa na porcentagem de aderência de ambos os macrófagos na presença dos extratos ( $p > 0,05$ ).

Figura 4 - Porcentagem de macrófagos C57BL/6 e Balb/c aderidos após incubação na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:4; 1:8; 1:12), após 2 horas de incubação



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

### 5.3 Ensaio de fagocitose da levedura *Saccharomyces boulardii*

A análise da capacidade de macrófagos C57/BL/6 e BALB/c em fagocitarem leveduras *S. Boulardii* foi realizada em 1 experimento, executado em quadruplicata (TABELA 1). Viu-se uma maior capacidade fagocítica pelos macrófagos C57BL/6 que aqueles BALB/c. As células C57BL/6 não tratadas (controle) apresentaram capacidade fagocítica igual ou maior que 95%, enquanto nos macrófagos BALB/c, tal capacidade variou de 60 a 65%. Os macrófagos C57BL/6 tratados com os extratos de Ultracal XS (1:8 e 1:12) apresentaram uma capacidade de fagocitose superior a 90%, enquanto nos macrófagos BALB/c tal capacidade variou de 50 a 58%. Por sua vez, os macrófagos C57BL/6 tratados com os extratos de BioC-Temp (1:8 e 1:12) apresentaram porcentagens que variaram de 80 a 90%, enquanto os macrófagos BALB/c, sob a mesmas condições, apresentaram porcentagens que variaram de 40 a 54.

Tabela 1: % de células fagocitadas por macrófagos C57BL/6 e Balb/c na presença dos extratos de Ultracal e BioC-Temp.

	C57BL/6			Balb/c				
CONTROL	95%	96%	94,50%	95%	60%	62%	63%	65,00%

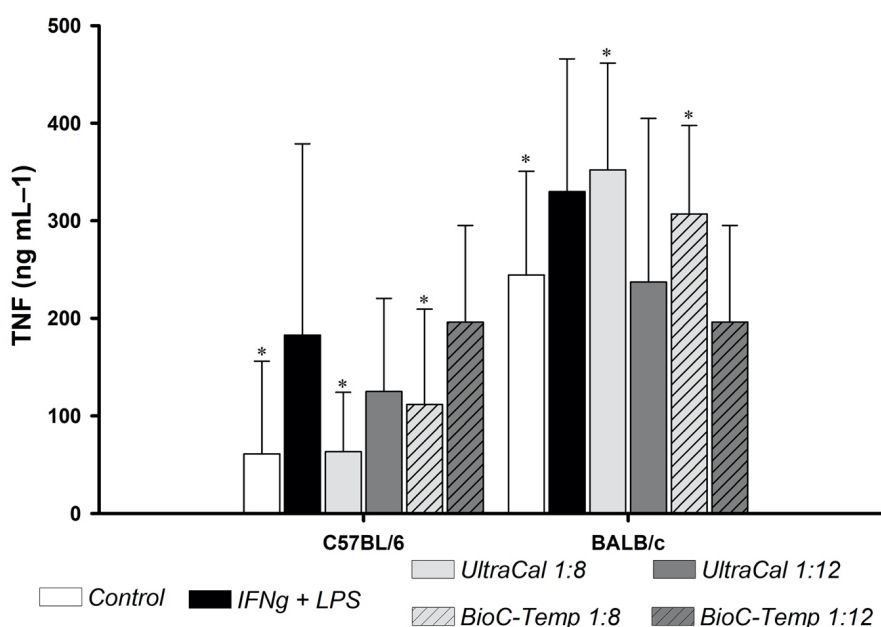
Ultracal 1:8	90%	91%	91,50%	90,50%	51,00%	56%	53,00%	54,00%
Ultracal 1:12	92,5	92%	93,50%	93,50%	52,00%	57%	58,00%	57%
BioC-Temp 1:8	80%	83,50%	82%	86%	41,00%	43%	40,00%	38,00%
BioC-Temp 1:12	85,50%	91,50%	87,50%	91%	50%	53	55%	54,00%

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

#### 5.4 Detecção de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

A produção de TNF- $\alpha$  está demonstrada na Figura 5. Houve diferença significativa na expressão de TNF- $\alpha$  quando se comparam as duas células, sob as mesmas condições: os controles, os tratamentos com Ultracal XS (1:8) e o BioC-Temp (1:8), com maior produção desta citocina observada nas culturas de macrófagos BALB/c.

Figura 5 - Produção de TNF por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12) após 24 horas de incubação.

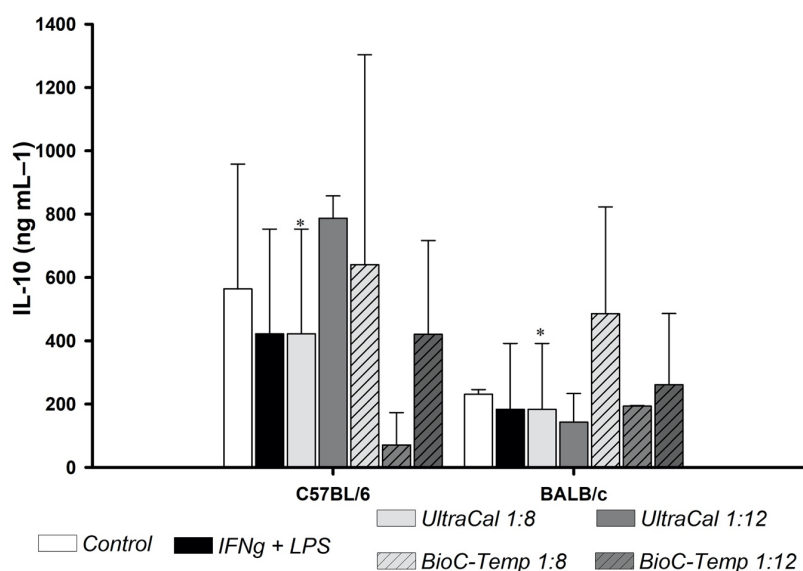


Fonte: elaborada pelo autor (2022).

#### 5.5 Detecção de Interleucina-10 (IL-10)

A Figura 6 representa a produção de IL-10 pelos macrófagos C57BL/6 e BALB/c tratados com os extratos de Ultracal XS e BioC-Temp. Os diferentes tratamentos apresentaram resultados similares ao grupo controle em camundongos C57BL/6 ( $p=0,115$ ) e BALB/c ( $p=0,439$ ). De maneira geral, não houve diferença entre tratamentos quando comparados camundongos C57BL/6 e BALB/c, apenas as culturas tratadas com o extrato de UltraCal XS (1:8) produziram maiores níveis de IL-10 em macrófagos C57BL/6 quando comparadas àqueles BALB/c ( $p=0,021$ ).

Figura 6 - Produção de IL-10 por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença e ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12) após 72 horas de incubação.



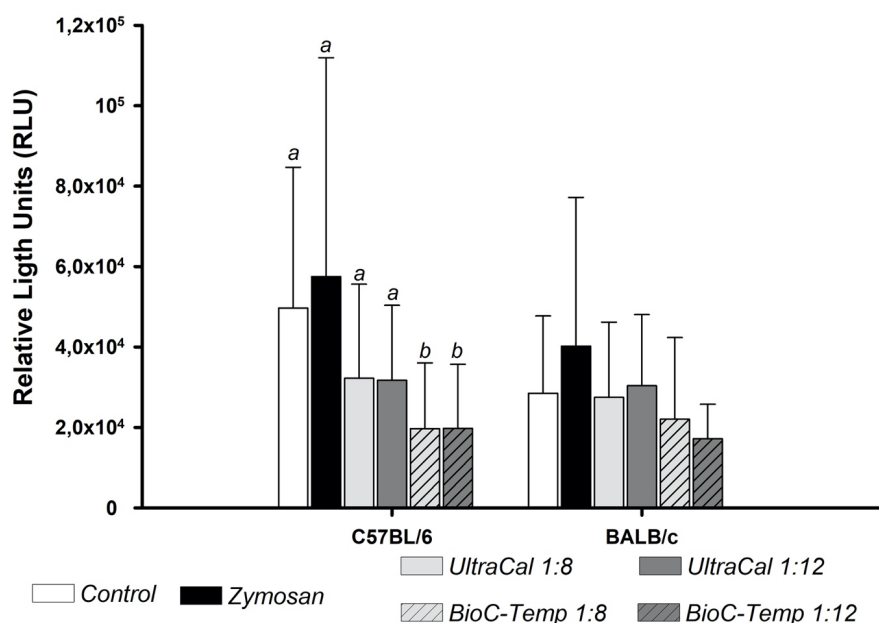
Fonte: elaborada pelo autor (2022).

### 5.6 Detecção de radicais intermediários de oxigênio (ROS)

A Figura 7 demonstra a produção de radicais intermediários de oxigênio nas culturas de macrófagos C57BL/6 e BALB/c tratados com os extratos de Ultracal XS e BioC-Temp (1:8 e 1:12). Não houve diferença na produção de ROS por macrófagos BALB/c em relação ao controle e aos demais extratos ( $p=0,253$ ). Para os macrófagos C57BL/6 houve menor produção significativa de ROS nas células tratadas com o BioC-Temp (1:8 e 1:12) em relação ao controle, células tratadas como Zymosan e aquelas tratadas com as duas concentrações dos extratos de Ultracal XS ( $p>0,05$ ).

Quando comparados os macrófagos C57BL/6 e BALB/c não houve diferença na produção de ROS sob os diferentes tratamentos ( $p>0,05$ ).

Figura 7 - Produção de radicais intermediários de oxigênio (ROS) por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença ou ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12) e estimulado com zymosan.

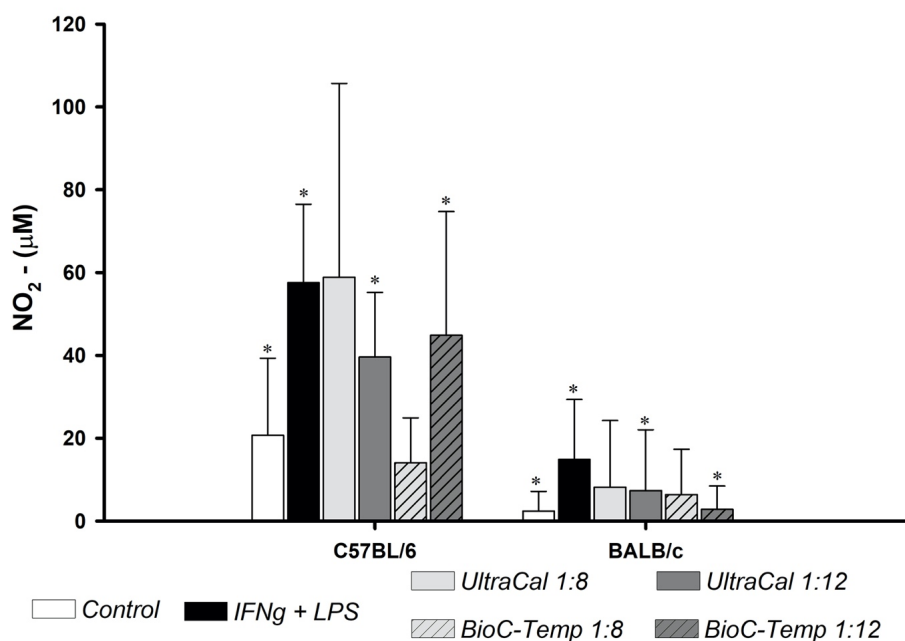


Fonte: elaborada pelo autor (2022).

### 5.7 Detecção de óxido nítrico (NO)

A Figura 8 representa a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos C57BL/6 e BALB/c tratadas com os extratos de Ultracal XS e BioC-Temp (1:8 e 1:12). Houve maior produção de NO pelos macrófagos C57BL/6 quando comparados aos BALB/c, havendo diferença significativa entre o controle, células tratadas com o IFN- $\gamma$ , Ultracal XS (1:8) e BioC-Temp (1:12).

Figura 8 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença e ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12) e estimulado por IFN $\gamma$  +LPS.

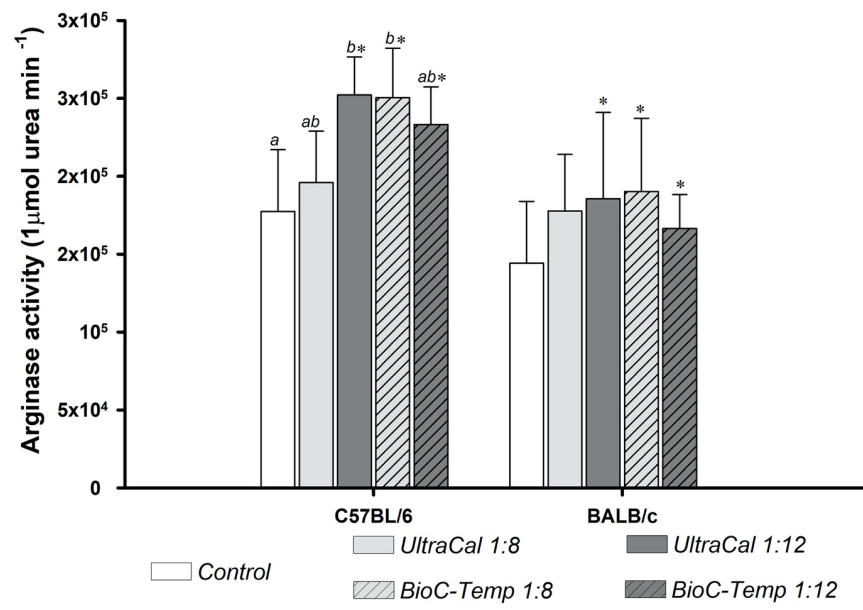


Fonte: elaborada pelo autor (2022).

### 5.8 Atividade da arginase

A Figura 9 demonstra a produção de arginase pelos macrófagos BALB/c e C57BL/6 tratados com os extratos de Ultracal XS e BioC-Temp nas concentrações de 1:8 e 1:12. Nos macrófagos C57BL/6 houve significativa maior produção em relação ao controle e às células tratadas como Ultracal XS (1:12) e BioC-Temp (1:8). Nas culturas de macrófagos BALB/c não houve diferença entre o controle e os demais tratamentos. Quando se comparam os macrófagos C57BL/6 e BALB/c, observa-se que houve significativa maior produção de arginase pelos macrófagos C57BL/6 tratados com Ultracal XS (1:12) e BioC-Temp (1:8 e 1:12) em relação aos mesmos tratamentos a que foram submetidos os macrófagos BALB/c.

Figura 9 - Produção de Arginase por macrófagos C57BL/6 e BALB/c na presença e ausência dos extratos de Ultracal e BioC-Temp (1:8; 1:12), após 48 horas de incubação.



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a atividade de macrófagos inflamatórios elicitados de duas linhagens de camundongos, C57BL/6 e BALB/c. Foram analisadas a viabilidade celular pelo ensaio de MTT e pela citometria de fluxo; a capacidade de aderência celular; a fagocitose de *Saccharomyces boulardii*; e, a produção de TNF, IL-10, ROI e NO, na presença e na ausência das medicações UltraCal XS e Bio-C Temp.

Nas culturas celulares não se utilizou os produtos em sua formulação original porque os mesmos se mostraram altamente citotóxicos. Assim, foram obtidos extratos de ambas as medicações, Ultracal XS e BioC-Temp, obtidos como previamente sugerido (FARIA *et al.*, 2018). Os extratos foram submetidos a diversas diluições (de 1:4; 1:8; 1:12) para se definir uma curva dose-resposta. A utilização dos extratos é importante, por um lado, porque é possível que ocorra, nos tecidos, a liberação de compostos lixiviáveis quando o material entra em contato com os mesmos e, assim, progressivamente, serem eliminados pela lavagem promovida pelos fluídos extracelulares (BARROS *et al.*, 2014). Contudo, neste estudo, *in vitro*, talvez o mais importante é que os extratos permitiram que se definisse as melhores concentrações para a manutenção da viabilidade celular em níveis elevados, favorecendo a realização das diferentes análises aqui propostas.

Espera-se que a atividade antimicrobiana e a biocompatibilidade sejam características que uma medicação intracanal ideal apresente (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Nesse contexto, o hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] tem sido amplamente utilizado como mediação intracanal, uma vez que possui tais características (Z. MOHAMMADI *et al.*, 2011), além de ser capaz de dissolver o tecido orgânico (G. HASSELGREN *et al.*, 1988) e inativar a endotoxina bacteriana (Tanomaru M *et al.*, 2003). Apesar dessas propriedades, o Ca(OH)<sub>2</sub> não apresenta características físicas satisfatórias, tais como, radiopacidade e fluidez (Fava *et al.*, 2003), clamando por novas estratégias (ORUCOGLU *et al.*, 2008). Nos anos recentes, novos medicamentos à base de Ca(OH)<sub>2</sub>, mas com melhorias em suas propriedades físicas, foram disponibilizados. Dentre eles, cita-se o UltraCal XS (Ultradent Products, Inc.). O Ultra-Cal XS apresenta



em sua composição 35% de hidróxido de cálcio, óxido de bário, como agente radiopacificante, e propilenoglicol, como veículo (BLANSCETI *et al.*, 2008).

Por sua vez, o Bio-C-Temp é um novo material biocerâmico contendo silicato de cálcio e indicado para ser utilizado como medicação intracanal (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A 2020). O BioC-Temp difere visualmente do UltraCal XS, tendo uma coloração mais amarelada e consistência ligeiramente diferente, provavelmente relacionada ao veículo utilizado.

Essas medicações ao serem utilizadas nos SCR irão entrar em íntimo contato com os tecidos perirradiculares, interferindo nas respostas imunoinflamatórias que ali se processam (TAVARES *et al.*, 2012). Neste estudo, optou-se pela utilização de macrófagos de duas linhagens, uma vez que estas células são as mais prevalentes nos tecidos perirradiculares inflamados (ORSTAVIKr & MJOER, 1992), estando envolvidas nas respostas imunes inata e adaptativa. O modelo aqui utilizado é bem avaliado, tendo sido objeto de vários estudos já realizados (BRAGA *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2015; da SILVA *et al.*, 2022; REZENDE *et al.*, 2005; REZENDE *et al.*, 2007; de OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003; ZU *et al.*, 2000).

O primeiro fator que irá interferir na atividade de macrófagos é a sua capacidade em permanecer vivo na presença de um estímulo. Desta maneira, estudos *in vitro*, iniciam-se por avaliar a viabilidade celular (BRAGA *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2015; da SILVA *et al.*, 2022; REZENDE *et al.*, 2005; REZENDE *et al.*, 2007; de OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003). Neste estudo, a análise de viabilidade pelo método do MTT (Figuras 1 e 2) demonstrou que o Ultracal XS, em ambos os tipos celulares, nas diferentes concentrações utilizadas (1:4, 1:8, 1:12), não interferiu na viabilidade de macrófagos, demonstrando sua biocompatibilidade, conforme previamente relatado por outros estudos (GUERREIRO *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Quanto ao BioC-Temp, viu-se que na concentração de 1:4 esse extrato induziu uma redução significativa na viabilidade celular ( $P < 0.05$ ), tanto nas culturas de macrófagos C57BL/6 quanto BALB/c, exacerbando-se às 72 hs. De acordo com estes achados, foi demonstrado que o Bio-C Temp apresenta menor biocompatibilidade do que o UltraCal" XS, em diferentes diluições (1: 1 e 1: 2), na presença de células pulpares estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Contudo, estes mesmos autores relataram que, em maiores diluições, o Bio-C Temp apresenta

biocompatibilidade semelhante ao UltraCal<sup>®</sup> XS (OLIVEIRA *et al.*, 2020), corroborando os achados que demonstram a biocompatibilidade de medicamentos intracanalais à base de hidróxido de cálcio (ANDOLFATTO *et al.*, 2012; da SILVA *et al.*, 2008; MCINTYRE *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos com a análise de viabilidade pela citometria de fluxo, confirmam os achados anteriores, demonstrando menor viabilidade do BioC-Temp (1:4) quando comparado ao grupo controle e ao Ultracal XS (1:4), tal qual demonstrado anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A citotoxicidade do Bio-C-Temp pode ser atribuída ao dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) presente em sua formulação (OLIVEIRA *et al.*, 2020). O TiO<sub>2</sub> causa diversos danos celulares (DHUPAL *et al.*, 2018). No entanto, é importante ressaltar que o Bio-C Temp apresentou uma citocompatibilidade semelhante ao UltraCal<sup>®</sup> XS em extratos menos concentrados.

A primeira etapa da atividade de macrófagos envolve a sua capacidade de aderência ao substrato (UNANUE *et al.*, 1987). Neste estudo, observou-se que ambos os medicamentos avaliados, Ultracal XS e BioC-Temp, nas diferentes concentrações e tipos celulares, não interferiram na aderência de macrófagos. Muitos estudos avaliaram a biocompatibilidade de materiais endodônticos sobre a capacidade de aderência de macrófagos (BRAGA *et al.*, 2015; da SILVA *et al.*, 2022; de OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003; REZENDE *et al.*, 2005; REZENDE *et al.*, 2007; ZU *et al.*, 2000). Contudo, alguns autores relataram uma menor aderência celular na presença de materiais à base de óxido de zinco e eugenol (de OLIVEIRA *et al.*, 2003; de OLIVEIRA *et al.*, 2010; SADEGHEIN *et al.*, 2001), de cimentos resinosos (BRAGA *et al.*, 2015) e outros produtos (SEGURA *et al.*, 1996; SEGURA *et al.*, 1998; RUBIO *et al.*, 1997)

Durante o processo de fagocitose os macrófagos secretam citocinas, responsáveis pelas alterações que se processam nos tecidos perirradiculares frente à agressão (BRACKETT *et al.*, 2011; SJORGREN *et al.*, 1998; STASHENKO *et al.*, 1998). Neste estudo, dosou-se as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, na presença e ausência dos extratos dos medicamentos, nas concentrações de 1:8 e 1:12. Como controle da reação, utilizou-se culturas tratadas com IFN- $\delta$  e LPS, mimetizando-se as condições clínicas (REZENDE *et al.*, 2005).

As principais funções do TNF- $\alpha$  se caracterizam pela indução da migração de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção, os ativando para que exerçam suas atividades de eliminação e remoção dos agentes agressores (XANTHOULEA *et al.*, 2004), além de induzir a ativação de osteoclastos (MACIEL *et al.*, 2012). Neste estudo, observou-se maior produção significativa de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos da linhagem BALB/c em relação aos C57BL/6 sob tratamento com as mesmas concentrações dos extratos. Diferentemente, Braga *et al* (2014) observaram maior produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos C57BL/6 que BALB/c quando estimulados com extratos do cimento endodôntico Fillapex (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil).

A interleucina-10 induz a homeostase tecidual, o que leva à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por células T ativadas e macrófagos (de Brito *et al.*, 2012), além de promover a síntese de colágeno e a proliferação celular (KAWASHIMA & STASHENKO, 1999). Observou-se que os macrófagos C57BL/6 e BALB/c induziram secreção similar desta citocina nas diferentes condições avaliadas. Contudo, ao se comparar as duas linhagens celulares, detectou-se que nas culturas tratadas com o UltraCal XS (1:8) uma produção aumentada de IL-10 pelos macrófagos C57BL/6 em relação aos macrófagos BALB/c. Os achados deste estudo parecem sugerir que as respostas de macrófagos são estímulo-dependente. Semelhantes ao observado aqui, Braga *et al.*, (2014) relataram maior produção de IL-10 por macrófagos BALB/c que macrófagos C57BL/6 quando estimulados com extratos do cimento endodôntico Fillapex (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil). Um aumento na expressão de IL-10 foi relatado, *in vivo*, em ratos, quando tubos de propileno contendo BioC-Temp foram implantados no subcutâneo dos animais (LOPES *et al.*, 2022).

Ambas as medicações ao serem aplicadas são colocadas em contato íntimo com os tecidos periapicais, que podem estar inflamados e ou infectados, sendo fundamental que não interfiram no processo de fagocitose. Neste estudo, a capacidade de macrófagos ingerirem a levedura *Saccharomyces boulardii* foi avaliada na presença de BioC temp e Ultracal XS. A seleção dessa levedura se deveu ao seu tamanho, que facilitou a sua contagem intra e extra celular (REZENDE *et al.*, 2007). As maiores capacidades fagocíticas foram observadas para os macrófagos C57BL/6 em detrimento dos BALB/c, tanto no grupo controle, quanto tratados com os extratos de Ultracal XS e BioC-Temp. De forma contrária, de Oliveira Mendes *et al* (2010)

avaliaram a influência de diferentes materiais a base de óxido de zinco e eugenol e observaram uma redução na atividade fagocítica de macrófagos C57BL/6 ao *S. boulardii*. Utilizando a mesma metodologia, Braga *et al* (2015) também encontraram resultados opostos aos deste estudo com maior atividade fagocitária sendo apresentada pelos macrófagos C57BL/6 quando estimulados com extratos de Fillapex (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil).

Após serem fagocitados os microrganismos são mortos no interior dos fagossomos via produção de ROS e NO (de OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2010). Neste estudo, os extratos de Ultracal XS e BioC-Temp não interferiram na produção de ROS pelos macrófagos BALB/c. Contudo, nos macrófagos C57BL/6, o BioC-Temp interferiu negativamente nessa produção em relação ao controle e ao Ultracal XS. Resultado diverso foi demonstrado por Braga *et al* (2014) ao estimularem macrófagos C57BL/6 com extratos do cimento Fillapex. Talvez esta diferença se deva a presença do dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) na composição do BioC-Temp.

Neste estudo a produção de NO foi significativamente maior nos macrófagos C57BL/6 que nos BALB/c sob os mesmos estímulos. De forma diversa, Resende *et al* (2007) não observaram diferença significativa quanto a produção de NO na presença de MTA, em macrófagos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. Por sua vez, na presença de extratos do cimento Fillapex (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), autores observaram menores produções de NO (BRAGA *et al.*, 2014; YOSHINO *et al.*, 2013).

Neste estudo, dosou-se a produção de arginase, baseado no fato de que, recentemente, os macrófagos foram divididos em duas subclasses, de acordo com sua habilidade em produzir diferentes tipos de respostas. Tal fato se baseou em estudos dos anos 80 que demonstraram que os camundongos C57BL/6 eram resistentes a infecções por *L. major*, enquanto os camundongos BALB/c eram sensíveis (HEINZEL *et al.*, 1988; SCOTT & FARRELL, 1982). Os macrófagos ativados de camundongos BALB/c preferencialmente converteriam a arginina em ureia e ornitina, que resultaria na produção de colágeno e proliferação celular (BASTOS *et al.*, 2002; MILLS *et al.*, 2000; MOSSER 2003), enquanto os macrófagos oriundos de camundongos C57BL/6 produziram preferencialmente óxido nítrico e ROS em resposta aos antígenos (MOSSER 2003). Neste estudo, diferentemente do esperado,

ao se comparar os macrófagos C57BL/6 e BALB/c, observou-se significativa maior atividade da arginase pelos primeiros quando tratados com Ultracal (1:12) e BioC-Temp (1:8 e 1:12). Por outro lado, Resende *et al* (2007) demonstraram em culturas tratadas com o MTA, que os macrófagos C57BL/6 apresentaram menor atividade da arginase que os macrófagos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. O resultado observado neste estudo quanto a atividade da arginase, associado a maior produção inesperada de IL-10 pelos macrófagos C57BL/6, que difere dos resultados demonstrados por Resende *et al* (2007) utilizando células oriundas de camundongos knock-out para o receptor p40, sugerem que a linhagem BALB/c não mimetiza, nesse tipo de experimento, aquele antagonismo observado anteriormente em infecções experimentais com *L. major* (HEINZEL *et al.*, 1988 SCOTT & FARREL, 1982).

## 8 CONCLUSÃO

Viu-se que:

- O BioC-Temp, na concentração de 1:4, induziu uma redução significativa na viabilidade celular, tempo dependente, pelo método do MTT
- Pela análise de Citometria de Fluxo observou-se que não houve diferenças significativas na viabilidade das culturas celulares de macrófagos C57BL/6 e BALB/c, tratadas com o Ultracal XS. Por sua vez, o extrato do BioC-Temp (1:4) reduziu significativamente a viabilidade dos macrófagos C57BL/6 e BALB/c;
- Os extratos de BioC-Temp e Ultracal XS não interferiram na capacidade de aderência celular de macrófagos BALB/c e C57BL/6;
- Houve uma maior capacidade fagocítica dos macrófagos C57BL/6 que BALB/c, na presença ou ausência dos extratos de BioC-Temp e Ultracal XS em fagocitarem a levedura *Saccharomyces boulardii*;
- Houve maior produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos BALB/c que aqueles C57BL/6 quando comparadas as culturas sem estímulo e estimuladas com Ultracal XS (1:8) e o BioC-Temp (1:8);
- Apenas as culturas tratadas com o extrato de UltraCal XS (1:8) produziram maiores níveis de IL-10 em macrófagos C57BL/6 quando comparadas àquelas com macrófagos BALB/c;
- Quando comparados os macrófagos C57BL/6 e BALB/c, não houve diferença na produção de ROS sob os diferentes tratamentos. Por sua vez, os macrófagos C57BL/6 produziram significativamente menores níveis de ROS quanto tratados com o BioC-Temp (1:8 e 1:12) em relação ao controle, às células tratadas como Zymosan e aquelas tratados com as duas concentrações dos extratos de Ultracal XS ( $p > 0,05$ ).

- Houve maior produção de NO pelos macrófagos C57BL/6 quando comparados aos BALB/c, havendo diferença significativa entre o controle, células tratadas com o IFN- $\delta$ , Ultracal XS (1:8) e BioC-Temp (1:12);

- Houve significativa maior atividade da arginase pelos macrófagos C57BL/6 tratados com Ultracal XS (1:12) e BioC-Temp (1:8 e 1:12) em relação aos mesmos tratamentos nos macrófagos BALB/c.

Conclui-se que:

Associado às excelentes propriedades clínicas previamente relatadas, o Ultracal XS quando interferiu nas respostas de macrófagos o fez positivamente, em todos os parâmetros aqui analisados. Por sua vez, o BioC-Temp, dependendo da concentração do extrato utilizado, interferiu negativamente na viabilidade celular e na produção de radicais de oxigênio, o que demanda novos estudos para se caracterizar quais de seus componentes podem ser substituídos ou terem suas concentrações ajustadas para melhoria em suas atividades biológicas.

## Referências Bibliográficas

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; POBER, Jordan S. **Cellular and molecular immunology**. 4a edição. Pennsylvania: W. B. Saunders company, 2000. 553p.

AL-HADDAD, A.; CHE AB AZIZ, Z. A. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. **International Journal of Biomaterials**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

ALANEZI, A. Z. et al. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 109, n. 3, p. e122–e125, mar. 2010.

ANDOLFATTO, C. et al. Biocompatibility of Intracanal Medications Based on Calcium Hydroxide. **ISRN Dentistry**, v. 2012, p. 1–6, 18 dez. 2012.

BASTOS, K. R. B. et al. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 2, p. 271–278, 1 fev. 2002.

BIO-C TEMP | **Angelus Odontologia**. Disponível em:

<<https://angelus.ind.br/produto/bio-c-temp/>>. Acesso em: 6 mar. 2023.

BLANSCET, M. L.; TORDIK, P. A.; GOODELL, G. G. An Agar Diffusion Comparison of the Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide at Five Different Concentrations with Three Different Vehicles. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 10, p. 1246–1248, out. 2008.

BRAGA, J. M. et al. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. **Dental Traumatology: Official Publication of International Association for Dental Traumatology**, v. 31, n. 5, p. 390–395, 1 out. 2015.

BRAGA, J. M. et al. The effects of a mineral trioxide aggregate-based sealer on the production of reactive oxygen species, nitrogen species and cytokines by two macrophage subtypes. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 10, p. 909–919, 1 out. 2014.

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo patologia geral. **Bogliolo patologia geral**, p. 312–312, 1998.

BUENO, C. R. E. et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, 2016.

BYSTROM, A.; CLAESSION, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide



in the treatment of infected root canals. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 1, n. 5, p. 170–175, 1 out. 1985.

CAMILLERI, J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. **Dental Materials**, v. 27, n. 8, p. 836–844, ago. 2011.

CANDEIRO, G. T. DE M. et al. Evaluation of Radiopacity, pH, Release of Calcium Ions, and Flow of a Bioceramic Root Canal Sealer. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 6, p. 842–845, jun. 2012.

CANDEIRO, G. T. M. et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 9, p. 858–864, 28 set. 2015.

CHALA, S.; ABOUQAL, R.; RIDA, S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: systematic review and meta-analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 112, n. 4, p. e36–e42, out. 2011.

CHENG, L. et al. Osteoinduction of hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1569–1574, abr. 2010.

COHEN, S; BURNS. Caminhos da Polpa. 7. ed.; Guanabara Koogan, 2000.

CORRALIZA, I. M. et al. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, n. 1-2, p. 231–235, set. 1994.

DA SILVA, D. C. et al. Cytotoxicity of two self-adhesive resin cements and their interference in the phagocytic activity of murine macrophages. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 47, n. 3, p. e31, 1 ago. 2022.

DE BRITO, L. C. N. et al. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 4, p. 481–485, 1 abr. 2012.

DE OLIVEIRA MENDES, S. et al. In Vitro Evaluation of the Cytotoxicity of Two Root Canal Sealers on Macrophage Activity. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 2, p. 95–99, fev. 2003.

DE OLIVEIRA MENDES, S. T. et al. A decrease in the innate immune response to infection in the presence of root canal sealers. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 109, n. 2, p. 315–323, 1 fev. 2010.

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. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 13, p. 6735–6750, out. 2018.

ESTRELA, C. et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Brazilian Dental Journal**, v. 10, n. 2, p. 63–72, 1999.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Brazilian Dental Journal**, v. 6, n. 2, p. 85–90, 1995.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. DE A.; PÉCORÁ, J. D. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 11, n. 2, p. 133–137, jun. 2003.

FABRICIUS, L. et al. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, n. 4, p. 278–285, 1 ago. 2006.

FARIA, G. et al. Influence of the Vehicle and Antibiotic Formulation on Cytotoxicity of Triple Antibiotic Paste. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 12, p. 1812–1816, dez. 2018.

FAVA, L. R. G.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 4, p. 257–282, jul. 1999.

GALLIN, J. I. Inflammation. In: PAUL, W. E. **Fundamental immunology**, 3ed. NY: Raven Press Ltda, 1993. p. 1015-1032.

GARALA, M. et al. A comparison of the minimum canal wall thickness remaining following preparation using two nickel-titanium rotary systems. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 9, p. 636–642, set. 2003.

GIAIMIS, J. et al. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **Journal of Immunological Methods**, v. 154, n. 2, p. 185–193, 2 out. 1992.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M. et al. Comparative Analysis of Enterococcus faecalis Biofilm Formation on Different Substrates. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 346–350, mar. 2013.

GUERREIRO, J. C. M. et al. Antibacterial activity, cytocompatibility and effect of Bio-C Temp bioceramic intracanal medicament on osteoblast biology. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 7, p. 1155–1165, 18 mar. 2021.

HAAPASALO, M. et al. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. **Endodontic Topics**, v. 10, n. 1, p. 77–102, mar. 2005.

HAMDAN, R. et al. The XP-Endo Finisher for the removal of calcium hydroxide paste from root canals and from the apical third. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, 2017.

HASSELGREN, G.; OLSSON, B.; CVEK, M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. **Journal of Endodontics**, v. 14, n. 3, p. 125–127, mar. 1988.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; LOCKSLEY, R. M. Leishmania major: Analysis of lymphocyte and macrophage cellular phenotypes during infection of susceptible and resistant mice. **Experimental Parasitology**, v. 65, n. 2, p. 258–268, abr. 1988.

HULSMANN, M.; PETERS, O. A.; DUMMER, P. M. H. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. **Endodontic Topics**, v. 10, n. 1, p. 30–76, mar. 2005.

JANEWAY, Charles et al. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. 5.ed. **Porto Alegre: Artmed, 2002**. viii, 767p. ISBN 8536300116.

JIMÉNEZ-RUBIO, A. et al. In vitro study of the effect of sodium hypochlorite and glutaraldehyde on substrate adherence capacity of macrophages. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 9, p. 562–564, set. 1997.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. THE EFFECTS OF SURGICAL EXPOSURES OF DENTAL PULPS IN GERM-FREE AND CONVENTIONAL LABORATORY RATS. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 20, p. 340–9, 1965.

KAUSHAL, N.; BANSAL, M. P. Dietary selenium variation-induced oxidative stress modulates CDC2/cyclin B1 expression and apoptosis of germ cells in mice testis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 8, p. 553–564, ago. 2007.

KAWASHIMA, N. et al. Root canal medicaments. **International Dental Journal**, v. 59, n. 1, p. 5–11, 1 fev. 2009.

KHAN, A. A.; SUN, X.; HARGREAVES, K. M. Effect of Calcium Hydroxide on Proinflammatory Cytokines and Neuropeptides. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1360–1363, nov. 2008.

KIM, D.; KIM, E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 39, n. 4, p. 241, 2014.

KINGSHOTT, P. et al. Surface modification and chemical surface analysis of biomaterials. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 5, p. 667–676, out. 2011.

KOCH, K. **Bioceramic technology -the game changer in endodontics**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.ibioceramix.com/files/endodontic\\_practice.pdf](https://www.ibioceramix.com/files/endodontic_practice.pdf)>. Acesso em: 6 mar. 2023.

LANA, M. A. et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, n. 2, p. 100–105, abr. 2001.

LANA, P. E. P. et al. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in Root Canal Systems. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 1, p. 32–36, 2009.

LAW, A.; MESSER, H. An Evidence-Based Analysis of the Antibacterial Effectiveness of Intracanal Medicaments. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 10, p. 689–694, out. 2004.

LEE, S.-J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 11, p. 541–544, nov. 1993.

LEONARDO, M. R. et al. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 102, n. 5, p. 680–685, 1 nov. 2006.

LEONARDO, M. R. et al. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. **Journal of Applied Oral Science**, v. 12, n. 2, p. 93–98, jun. 2004.

LIMA, R. K. P. et al. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 4, p. 311–316, 14 nov. 2011.

LOPES, C. S. et al. Hepatic enzymes and immunoinflammatory response to Bio-C Temp bioceramic intracanal medication implanted into the subcutaneous tissue of rats. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2788, 18 fev. 2022.

MACIEL, K. F. et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 4, p. 354–362, 10 jan. 2012.

MCINTYRE, P. W. et al. The antimicrobial properties, cytotoxicity, and differentiation potential of double antibiotic intracanal medicaments loaded into hydrogel system. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 3, p. 1051–1059, 25 jun. 2018.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 12, p. 6166–73, 2000.

MOHAMMADI, Z.; DUMMER, P. M. H. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 8, p. 697–730, 2 maio 2011.

MÖLLER, A. J. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. **Odontologisk Tidskrift**, v. 74, n. 5, p. Suppl:1-380, 20 dez. 1966.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209–212, fev. 2003.

MUKHTAR-FAYYAD, D. Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 112, n. 6, p. e137-142, 1 dez. 2011.

NASSEH, A. The rise of bioceramics. **Endodontic Practice 2009**; 2:17-22.

OCHOA-RODRÍGUEZ, V. M. et al. Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, 2019.

OLIVEIRA, L. V. et al. A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. **International Endodontic Journal**, 21 maio 2020.

OLIVEIRA, L. V. et al. Biological parameters, discolouration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 11, p. 2133–2144, 1 nov. 2021.

OLSSON, B.; SLIWKOWSKI, A.; LANGELAND, K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v. 7, n. 8, p. 355–369, ago. 1981.

ORUCOGLU, H.; COBANKARA, F. Effect of Unintentionally Extruded Calcium Hydroxide Paste Including Barium Sulfate as a Radiopaquing Agent in Treatment of Teeth with Periapical Lesions: Report of a Case. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 7, p. 888–891, jul. 2008.

PETERS, O. Current Challenges and Concepts in the Preparation of Root Canal Systems: A Review. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 8, p. 559–567, ago. 2004.

PETTIETTE, M.; OLUTAYODELANO, E.; TROPE, M. Evaluation of Success Rate of Endodontic Treatment Performed by Students with Stainless-Steel K-Files and

- Nickel–Titanium Hand Files. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 2, p. 124–127, fev. 2001.
- REZENDE, T. M. B. et al. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 12, p. 896–903, 1 dez. 2005.
- REZENDE, T. M. B. et al. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 8, p. 603–611, 1 ago. 2007.
- SADEGHEIN, A.; BOLHARI, B.; SARAFNEJAD, A. A comparison of the effect of three endodontic sealers on adherence of mouse peritoneal macrophages. **Journal of the California Dental Association**, v. 29, n. 9, p. 673–677, 1 set. 2001.
- SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **Journal of Endodontics**, v. 20, n. 3, p. 127–129, mar. 1994.
- SAKAMOTO, M. et al. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 2, p. 112–122, 1 abr. 2006.
- SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dental Clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 269–296, 1 abr. 1974.
- SCOTT, P. A.; FARRELL, J. P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Disseminated Leishmaniasis in Genetically Susceptible and Resistant Mice \*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 2, p. 230–238, 1 mar. 1982.
- SEGURA, J. J. et al. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 7, p. 337–340, 1 jul. 1996.
- SEGURA, J. J.; JIMÉNEZ-RUBIO, A. Effect of eugenol on macrophage adhesion in vitro to plastic surfaces. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 14, n. 2, p. 72–74, 1 abr. 1998.
- SIMI JUNIOR, J. et al. Histological analysis of the biocompatibility of calcium hydroxide associated with a new vehicle. **Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research**, v. 26, n. 6, p. 627–632, 2015.
- ŠIMUNDIĆ MUNIĆ, M. et al. Antimicrobial efficacy of commercially available endodontic bioceramic root canal sealers: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 14, n. 10, p. e0223575, 17 out. 2019.

SIQUEIRA, J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 5, p. 361–369, set. 1999.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301.e3, nov. 2008.

STITES, Daniel P.; TERR, Abba I. **Imunologia básica**. 1a edição. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1992, 187p.

SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 7, n. 5, p. 257–262, out. 1992.

TAKAHASHI. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 5, p. 311–325, set. 1998.

TANOMARU, J. M. G. et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 11, p. 733–739, 22 out. 2003.

TANOMARUFILHO, M.; LEONARDO, M.; BEZERRADASILVA, L. Effect of Irrigating Solution and Calcium Hydroxide Root Canal Dressing on the Repair of Apical and Periapical Tissues of Teeth with Periapical Lesion. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 4, p. 295–299, abr. 2002.

TAVARES, W. L. F. et al. Effects of Calcium Hydroxide on Cytokine Expression in Endodontic Infections. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 10, p. 1368–1371, 1 out. 2012.

TAVARES, W. L. F. et al. The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 7, p. 889–892, 1 jul. 2013.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING R. C. **Inflamação – Uma revisão do Processo**. 6ed. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 172p., 1996

TRUSH, Michael A.; WILSON, Mark E.; DYKE, Knox Van. The generation of chemiluminescence by phagocytic cells. In: COLOWICK, Sidney P.; KAPLAN, Nathan O. **Methods in enzymology**. 1 edição. Londres; Academic Press, 1978. v. LVII, cap. 39, p. 462- 493.

UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M. The Immunoregulatory Role of the Macrophage. **Hospital Practice**, v. 22, n. 4, p. 87–104, 15 abr. 1987.

VILLA, N. et al. A New Calcium Silicate-Based Root Canal Dressing: Physical and Chemical Properties, Cytotoxicity and Dentinal Tubule Penetration. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, n. 6, p. 598–604, nov. 2020.

XANTHOULEA, S. et al. Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Shedding Controls Thresholds of Innate Immune Activation That Balance Opposing TNF Functions in Infectious and Inflammatory Diseases. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 3, p. 367–376, 2 ago. 2004.

YOSHINO, P. et al. In Vitro Cytotoxicity of White MTA, MTA Fillapex® and Portland Cement on Human Periodontal Ligament Fibroblasts. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 2, p. 111–116, abr. 2013.

ZANCAN, R. F. et al. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 12, p. 1822–1828, dez. 2016.

ZANCAN, R. F. et al. Do different strains of *E. faecalis* have the same behavior towards intracanal medications in in vitro research? **Brazilian Oral Research**, v. 32, p. e46, 24 maio 2018.

ZHU, Q. et al. Adhesion of Human Osteoblasts on Root-End Filling Materials. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 7, p. 404–406, jul. 2000.