

LAYARA CRISTINE TOMAZ TAVARES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS
FRENTE AOS CIMENTOS BIOCERÂMICOS**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2019**

Layara Cristine Tomaz Tavares

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS
FRENTE AOS CIMENTOS BIOCERÂMICOS**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia - área de concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr.º Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

Coorientador: Prof. Dr.º Warley Luciano Fonseca Tavares

Ficha Catalográfica

T231a Tavares, Layara Cristine Tomaz.
2019 Avaliação da resposta de macrófagos inflamatórios frente
T aos cimentos biocerâmicos / Layara Cristine Tomaz Tavares. -
- 2019.

53 f. : il.

Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Coorientador: Warley Luciano Fonseca Tavares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Endodontia. 2. Cimentos dentários. 3. Obturação do canal radicular. 4. Macrófagos. I. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Tavares, Warley Luciano Fonseca. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Sérgio Barbosa dos Santos - CRB: 6/3182.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



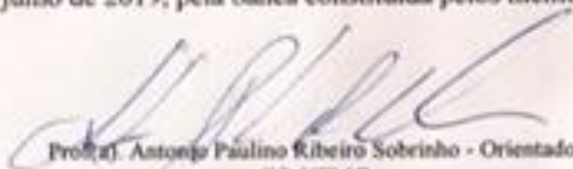
FOLHA DE APROVAÇÃO

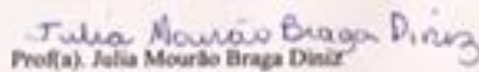
AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS FRENTE AOS CIMENTOS BIOCERÂMICOS.


LAYARA CRISTINE TOMAZ TAVARES

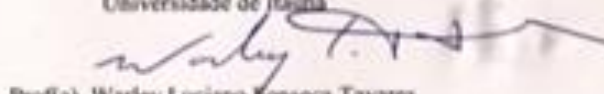
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Endodontia.

Aprovada em 30 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho - Orientador
FO-UFMG


Prof(a). Julia Mourão Braga Diniz
Faculdade Arnaldo


Prof(a). Gil Moreira Júnior
Universidade de Itajubá


Prof(a). Warley Luciano Fonseca Tavares
UFMG

Belo Horizonte, 30 de julho de 2019.

Aos meus pais Heliara e Valmir, que sempre fizeram o possível e o impossível para que pudesse realizar os meus sonhos, me apoiando em todas as etapas. Ao meu irmão Matheus e minha avó Margarida por todo carinho, apoio e confiança a mim depositados. Aos meus amigos, por fazerem a vida mais alegre e leve. Obrigada por serem tão especiais em minha vida, amo vocês.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiro a Deus por me permitir ter saúde e discernimento para realizar este sonho com muita sabedoria e empenho, e por me dar forças para seguir em frente. À toda a minha família que são luz para minha vida e sempre me apoiam nas minhas decisões. Ao meu co-orientador, professor Dr.º Warley Luciano Fonseca Tavares e orientador, professor Dr.º Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho por toda a ajuda dispensada a mim durante a realização deste trabalho, dúvidas, conselhos e ensinamentos. À professora Dr^a Leda Quércia Vieira pela parceria e por ter disponibilizado seu laboratório para que este trabalho fosse realizado. Ao Danilo e à Betânia que muito me ajudaram em todas as etapas deste trabalho e pela amizade que construímos. À Aline por toda ajuda desde o início do mestrado, pelos conselhos e por não ter deixado desanimar durante todo o percurso.

Aos alunos do Laboratório de Gnobiologia e Imunologia, em especial ao Leonardo e Diego que não mediram esforços para me ajudar nos momentos de dúvidas e incertezas. Aos amigos que fiz durante o mestrado, em especial à Sylvia, Cláudio, Pati e Marcela. Ao CNPQ pelo apoio financeiro e às empresas Angelus e MK Life pela doação dos cimentos testados nesta pesquisa. O meu muito obrigada, sem vocês este sonho não teria se concretizado.

RESUMO

As propriedades e a composição dos cimentos endodônticos podem influenciar nas reações inflamatórias perirradiculares e comprometer o sucesso do tratamento endodôntico. Os macrófagos estão presentes no infiltrado inflamatório periapical, envolvidos na eliminação e controle microbiano nesta região. Este estudo avaliou a atividade de viabilidade celular, aderência, fagocitose da levedura *S. boulardii*, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), e das citocinas (TNF- α e TGF- β) por macrófagos peritoneais murinos de perfil pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2) obtidos de camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente. Os macrófagos foram obtidos e a suspensão celular foi colocada em contato com capilares contendo ou não os cimentos Endosequence BC Sealer (BC), Sealer Plus BC (MK), Bio-c Sealer (Ang) e MTA. Mensurou-se a viabilidade celular pelos métodos da exclusão do azul de tripan e por MTT nos tempos 24, 48 e 72 horas. No primeiro ensaio, foi encontrada viabilidade celular semelhante entre os biocerâmicos e o MTA nos tempos testados; no entanto, houve diferença significativa em 72h entre BC e controle (capilar vazio); para o MTT houve diferença com o controle entre: Ang (24h), BC e MK (48h) para M1; para M2, MK (24h), Ang (48h) e BC, Ang, MTA (72h) ($p < 0,05$). Nos ensaios de aderência e de fagocitose não houve diferença significativa para os materiais testados em ambos os subtipos de macrófago. Em relação à produção de ROS, houve uma maior expressão para M1 em comparação com M2. Na ausência do Zimosan não houve produção significativa entre os cimentos, para ambos os macrófagos. Na presença do Zimosan A, o cimento MK apresentou maior produção que os grupos tratados com Ang e MTA, e controle ($p < 0,05$) para macrófago M1. No ensaio de detecção de NO, na presença do estímulo, todos os cimentos testados apresentaram diferenças significativas com o controle, para o macrófago M1. Na dosagem de TNF houve diferença significativa somente para macrófagos M1, com uma maior produção pelo cimento Endosequence BC, mesmo sem estímulo; sobretudo, quando estimulados com IFN- γ , BC apresentou maior produção que os grupos tratados MK e Ang; e, todos os grupos apresentaram diferenças em relação ao controle. A dosagem de TGF- β não apresentou diferenças para os grupos tratados na presença ou ausência do estímulo. Concluiu-se que a composição dos biocerâmicos, à base de silicato de cálcio, semelhante à do MTA, permitiu que os biocerâmicos não interferissem nas respostas de macrófagos de ambas as linhagens testadas.

α

Palavras-chave: Macrófago. Obtenção do canal radicular. Cimentos dentários.

ABSTRACT

Evaluation of the inflammatory macrophagus response in front of bioceramic cements

The properties and compositions of endodontic sealers may influence the periradicular inflammatory reactions and compromise the success of endodontic treatment. Macrophages are present in the periapical inflammatory infiltrate, being involved in the microbial clearance in this region. This study evaluated the cell viability, adhesion, phagocytosis of *S. boulardii*, production of reactive oxygen species (ROS) and nitrite oxide (NO) and cytokines (TNF and TGF- β) by murine peritoneal macrophages of pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) profiles obtained from C57BL / 6 and BALB / c mice, respectively. Macrophages were obtained and the cell suspension was placed in contact with capillaries containing or not the sealers Endosequence BC Sealer (BC), Sealer Plus BC (MK), Bio-c Sealer (Ang) e MTA. Cell viability was measured by the methods of tripan blue exclusion and by MTT at times 24, 48 and 72 hours. In the first assay, similar cell viability was found between the bioceramic and the MTA in the tested times; However, there was a significant difference in 72h between BC and control (empty capillary); For the MTT there was a difference with the control between: Ang (24h), BC e MK (48h) para M1; para M2, MK (24h), Ang (48h) e BC, Ang, MTA (72h) ($p < 0,05$). In the adherence and phagocytosis assays there was no significant difference for the materials tested in both macrophage subtypes. Regarding the production of ROS, there was a greater expression for M1 compared to M2. In the absence of Zymosan there was no significant production between the sealers for both macrophages. In the presence of Zimosan A, the MK cement presented higher production than the groups treated with Ang and MTA, and control ($p < 0.05$) for M1 macrophages. In the NO detection assay, in the presence of the stimulus, all the sealers tested showed significant differences with the control, for the M1 macrophage. In the TNF there was only difference for M1, with a higher production by the Endosequence BC even without stimulus, when stimulated with IFN- γ , BC showed higher production than the treated groups MK and Ang; and all groups showed differences in relation to control. The TGF- β dosage did not present difference for the groups treated in the presence or absence of the stimulus. It was concluded that the calcium silicate composition, similar to that of MTA, allowed the bioceramics to not interfere in the macrophages responses of both tested strains.

Keywords: Macrophage. Root canal obturation. Dental cements.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Nome comercial, composição, fabricante, local de fabricação e lote dos materiais. _____ 20

Figure 1- Percentage of macrophages M1 (a) and M2 (b) after MTT Cell viability assay with capillaries containing the bioceramics, MTA and control group. (*) indicates a statistical difference between groups ($p < 0.05$). Percentage of macrophages M1 (c) e M2 (d) after Cell viability assay with Trypan blue exclusion method, after direct contact with bioceramics, MTA and control in the intervals of 24, 48 and 72hours (*) indicates a statistical difference between groups ($p < 0.05$). _____ 33

Figure 2: Percentage of adhered cells of M1 (a) and macrophages of M2 (b) after the adherence assay with capillaries containing the bioceramics, MTA and control group. Percentage of yeasts phagocytosed by macrophages M1 (c) and M2 (d), after the phagocytosis assay with capillaries containing the sealers and control. For both assays, there was no significant difference between the different groups tested in both cell types. _____ 34

Figure 3. Mean of the luminescence expressed by the area under the curve of the ROS' production by macrophages M1 (a) and M2 (b) after contact with capillaries. M indicates cultures of macrophages in the presence of capillaries containing or not the sealers; M + Z indicates cultures of macrophages in the capillaries with Zimosan A. (*) indicates the statistical difference between groups ($p < 0.05$). Production of nitric oxide by macrophages M1 (c) and M2 (d) with capillaries containing bioceramics, MTA and control group, in the presence or absence of a stimulus (M= macrophages and M+IFN= macrophages + Interferon Gamma). (★) indicates a statistical difference between all sealers tested with the control group ($p < 0.05$) _____ 35

Figure 4. Production of TNF by macrophages M1 (a) and M2 (b), after the presence of a stimulus (macrophages and Interferon Gamma -M+IFN) or only macrophages (M) with capillaries containing bioceramics, MTA and control group. (*) indicates a

statistical difference between groups, and (★) indicates a statistical difference between all the tested sealers and the control group ($p < 0.05$). Production of TGF- β by macrophages M1 (c) and M2 (d), after the presence of a stimulus (macrophages and Lipolysaccharide -M+LPS) or only macrophages (M) with capillaries containing bioceramics, MTA and control group. No significant difference was found between the groups for both macrophages subtypes. _____36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFN- γ	Interferon Gama
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-10	Interleucina 10
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
LPS	Lipopolissacarídeo
MTA	Agregado de Trióxido Mineral
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salino
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SCR	Sistema de Canais Radiculares
TNF	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
U	Unidades

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Obturação do sistema de canais radiculares	11
1.2 Agregado de trióxido mineral	11
1.3 MTA Fillapex	12
1.4 Cimentos biocerâmicos	13
1.5 Macrófagos e a resposta imune	15
2 OBJETIVOS	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 Animais	22
3.2 Preparo dos cimentos	22
3.3 Obtenção e cultura dos macrófagos peritoneais inflamatórios	22
3.4 Viabilidade Celular	23
3.5 Aderência celular	24
3.6 Fagocitose	24
3.7 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	25
3.8 Produção de óxido nítrico (NO)	26
3.9 Produção de TNF- α e TGF- β por ELISA (Ensaio imunoenzimático)	26
3.10 Análises estatísticas	26
4 RESULTADOS	28
5 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO A-	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obturação do sistema de canais radiculares

O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado com a manutenção de um ambiente estéril em casos de tratamentos com polpas vitais, e, em casos de infecção, com a eliminação ou a significativa diminuição da microbiota. Tais objetivos são alcançados por meio do preparo químico-mecânico, seguido da obturação do sistema de canais radiculares (SCR) (BERNATH e SZABÓ, 2003; LOPES e SIQUEIRA, 2015).

A obturação do SCR visa uma vedação hermética tridimensional utilizando-se um material obturador principal associado aos cimentos obturadores. A gutta percha é um material padrão-ouro para o preenchimento do canal radicular principal, já os cimentos obturadores são utilizados para reduzir a interface existente entre a gutta percha e às paredes dentinárias, bem como, para alcançar regiões de maior complexidade anatômica, como istmos e deltas apicais (BIN *et al.*, 2012; LOPES e SIQUEIRA, 2015; NG *et al.*, 2008).

Encontram-se disponíveis diversos tipos de cimentos endodônticos obturadores que devem apresentar algumas características ideais: servir como um lubrificante; não manchar a estrutura dentária; ser estável dimensionalmente; ser antimicrobiano; radiopaco; apresentar bom manuseio; ter bom tempo de trabalho; ser de fácil inserção e remoção; levar à uma vedação impermeável do SCR; apresentar adesividade às paredes dentinárias; estimular a regeneração dos tecidos circundantes e ser biocompatível com o tecido do hospedeiro (ALMEIDA *et al.*, 2019; CASTELLUCCI *et al.*, 2005; GROSSMAN 1976; LOPES e SIQUEIRA, 2015; PRIYANKA e VERONICA, 2013; ZHANG, LI e PENG, 2009).

1.2 Agregado de trióxido mineral

Apesar de ainda não ter sido desenvolvido um material obturador que contém todas as características ideais, desenvolveram-se novos cimentos com propriedades melhoradas. Nos anos 90, o agregado de trióxido mineral (MTA) começou a ser utilizado na Endodontia, comercializado com as denominações ProRoot MTA® (Dentply, Tulsa Dental, USA) e MTA-Angelus® (Angelus, Londrina, Brasil). Ambos

são considerados cimentos biocerâmicos em virtude de suas partículas hidrofílicas serem constituídas de silicato de cálcio e óxidos de minerais (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010).

O MTA apresenta propriedades distintas em relação aos cimentos endodônticos convencionais, representados pela sua bioatividade e hidrofília. O caráter bioativo induz a liberação de seus componentes iônicos que interferem na atividade celular da região em que está inserido, produzindo uma matriz mineralizada responsável pela indução do reparo tecidual (FORD *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 2007). Já a sua hidrofília, permite a interação com ambientes úmidos, como túbulos dentinários e fluidos teciduais, sem alteração de suas propriedades, promovendo maior adesão à superfície e ligeira expansão, capaz de diminuir a micro-infiltração e selar comunicações (BOZEMAN, LEMON e ELEAZER, 2006; LEE, MONSEF e TORABINEJAD, 1993; SCARPARO, HADDAD e ACASIGUA, 2010; TORABINEJAD e CHIVIAN 1999). Além disso, possui pH alcalino que favorece suas propriedades antimicrobianas (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010) e uma excelente biocompatibilidade com células tronco pulpares (LIU, WANG e DONG, 2015), fibroblastos gengivais (ZHOU *et al.*, 2015), osteoblastos (PENG *et al.*, 2011), fibroblastos dérmicos humanos (DAMAS *et al.*, 2011) e macrófagos (BRAGA *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2015; REZENDE *et al.*, 2005; REZENDE *et al.*, 2007). É um material considerado padrão-ouro para procedimentos como pulpotomia, reabsorções internas e externas, retro obturação, tratamento de dentes invaginados e com rizogênese incompleta, apicificação, fraturas e perfurações (DE DEUS *et al.*, 2012). Também pode ser utilizado na obturação radicular, especialmente em casos de extensas reabsorções e variações anatômicas complexas (BOGEN e KUTTLER, 2009). Apesar do MTA apresentar várias das características que poderiam classificá-lo como um cimento obturador do SCR, ainda apresenta algumas desvantagens que podem ser observadas durante o seu uso clínico, como, a consistência arenosa, falta de escoamento e a dificuldade de inserção/ remoção dentro do espaço do canal radicular, especialmente em canais curvos (BOGEN e KUTTLER, 2009; LEE *et al.*, 2004; LOPES e SIQUEIRA, 2015).

1.3 MTA Fillapex

Na tentativa de combinar as propriedades físico-químicas de um cimento obturador com as propriedades biológicas do MTA, desenvolveram-se o MTA Fillapex® (Angelus). De acordo com o fabricante, é considerado um cimento biocerâmico por ter em sua composição o agregado de trióxido mineral, sendo composto por duas pastas, a base e catalisadora. A pasta base é constituída por: resina salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada e pigmentos; enquanto que a pasta catalisadora possui resina Diluente, MTA, sílica nanoparticulada e pigmentos.

Este cimento apresentou uma consistência mais fluida e um maior escoamento, porém, não apresentou vantagens de biocompatibilidade quando comparado com os cimentos AH Plus, EndoFill (TAVARES *et al.*, 2013) e MTA (BRAGA *et al.*, 2015), como também, foi altamente citotóxico para fibroblastos gengivais humanos (ZHOU *et al.*, 2015), fibroblastos de camundongos (BARABA *et al.*, 2016) e macrófagos (BRAGA *et al.*, 2015). Todavia, independente das propriedades físico-químicas dos cimentos obturadores endodônticos, se os mesmos não forem biocompatíveis, podem causar a degeneração dos tecidos periapicais e retardar a cicatrização em casos de lesões perirradiculares (MURRAY *et al.*, 2007; SOUSA, CAVALCANTI e MARQUES, 2009).

1.4 Cimentos biocerâmicos

Recentemente, em busca de materiais obturadores mais biocompatíveis, desenvolveram-se os cimentos biocerâmicos. Estes são constituídos por partículas cerâmicas, semelhante ao MTA, mas, com propriedades físicas melhoradas (DE DEUS *et al.*, 2012). São materiais bioativos, hidrofílicos, compostos por nano partículas, que permitem a maior penetração e adesão às paredes dentinárias (AL-HADDAD, AB AZIZ e ZETI, 2016; KOCH e BRAVE, 2012).

Os biocerâmicos vieram inicialmente de uma combinação de silicato de cálcio e fosfato de cálcio (LOUSHINE *et al.*, 2011), mas podem ser constituídos por partículas cerâmicas distintas como alumina, óxido de zircônia, vidROS bioativos e hidroxiapatita, sendo classificados como bioinertes e bioativos em função de sua composição (HENCH, 1991). Além disso, similar ao MTA, o fosfato de cálcio presente em sua composição interage com os fluidos teciduais e levam à formação do hidróxido de cálcio e/ou hidroxiapatita, importantes para o reparo dos tecidos

mineralizados (CAMILLERI *et al.*, 2015; CANDEIRO *et al.*, 2012; JITARU *et al.*, 2016). São materiais biocompatíveis quando incubados na presença de fibroblastos gengivais humanos (CANDEIRO *et al.*, 2016) e células mesenquimais (OLIVEIRA *et al.*, 2018). São quimicamente estáveis e, a presença de umidade induz o seu processo de presa e favorece sua expansão no interior do canal radicular (BALGUERIE *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2018), proporcionando maior vedamento quando comparado aos cimentos obturadores convencionais (KOCH e BRAVE, 2012; TROPE, BUNES e DEBELIAN, 2015; ZANG, LI e PENG, 2009). Possuem natureza alcalina, com alto pH nas primeiras 24 horas após a sua inserção (ALMEIDA *et al.*, 2017; KOCH e BRAVE, 2012), conseguindo manter a alcalinização a longo prazo, o que favorece seu alto poder antimicrobiano (ZAMPARINI *et al.*, 2019). Apresentam alta radiopacidade (ALMEIDA *et al.*, 2017; BORGES *et al.*, 2012; CANDEIRO *et al.*, 2012, ZAMPARINI *et al.*, 2019) e alta liberação de íons cálcio (BORGES *et al.*, 2012; CANDEIRO *et al.*, 2012; ZAMPARINI *et al.*, 2019), bem como, estimula proteínas associadas ao crescimento ósseo (JUNG, PARK e HAN, 2010).

Um exemplo de biocerâmico obturador é o Endosequence BC Sealer® (Brasseler, Savannah, Geórgia, EUA), que, segundo o fabricante, contém todas as características supracitadas, apresentando como principais vantagens a sua hidrofília, o não encolhimento pós presa, a ligação química às paredes dentinárias, bem como, sua partícula pequena de 2 micrômetros (μm) (KOCH e BRAVE, 2012). A indústria brasileira lançou no mercado seus primeiros cimentos biocerâmicos: Sealer Plus Bc® (MK Life, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) e Bio-C Sealer® (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), ambos indicados para obturação radicular de dentes permanentes. O primeiro, é constituído principalmente por óxido de zircônio (35 a 45%) e silicato tri-cálcico (20-35%), é um cimento insolúvel, radiopaco e sem alumínio que, segundo o fabricante necessita da presença de umidade para tomar presa e durante a fase presa não ocorre contração do produto. Já o Bio-C Sealer® é constituído por silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão. É também um produto bioativo, pronto para uso, que não sofre contração após presa.

É sabido que, embora os materiais obturadores estejam contidos dentro do espaço do canal radicular são capazes de interagir diretamente com os tecidos do ligamento periodontal através do forame apical e comunicações acessórias

(BERNATH e SZABÓ, 2003; BRACKETT *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2016) e podem influenciar nas reações inflamatórias da região em função de suas propriedades e composições (BERNATH e SZABÓ, 2003). Desse modo, o sistema imune atua por meio de suas respostas inatas e adaptativas com o objetivo de impedir que a infecção progrida para outras áreas do corpo (BARABA *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2016; DE BRITO *et al.*, 2012; STASHENKO, TELES e D'SOUZA, 1998). Os macrófagos são células importantes neste mecanismo de defesa, pois são encontrados no infiltrado inflamatório periapical (HASTURK, KANTARCI e VAN DYKE, 2012; VAN DYKE, 2008).

1.5 Macrófagos e a resposta imune

Os macrófagos são células mononucleares que fagocitam intensamente e, na ausência de inflamação seu papel principal é o de remover células mortas e danificadas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015; SJOGREN *et al.*, 1998). Estão presentes nas lesões perirradiculares humanas, representados em aproximadamente 46% das células inflamatórias (STERN *et al.*, 1981), contribuindo para prevenção da disseminação bacteriana do SCR infectado para outras áreas do corpo (LOPES e SIQUEIRA, 2015; METZGER, 2000).

Durante a inflamação, endotoxinas produzidas por micro-organismos se ligam aos receptores dos macrófagos e levam à sua estimulação. Estes, guiados por um fator quimiotático, deixam a circulação e se acumulam no sítio tecidual (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015; FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005; MOSSER e EDWARDS, 2008). Os macrófagos ativados levam às respostas funcionais nas seguintes etapas: inicialmente ocorre o reconhecimento dos agentes infecciosos, depois, durante a fagocitose, faz-se a adesão às células invasoras e, posteriormente, o seu engolfamento. Nos fagossomos ocorrerá a eliminação do patógeno, via metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio. Ademais, os macrófagos são responsáveis por apresentar os antígenos aos linfócitos T e B produzindo citocinas, imunoglobulinas e fatores de crescimento (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

Relacionando-se aos diferentes perfis de citocinas produzidas e a habilidade de produzir diferentes tipos de resposta inflamatória, os macrófagos foram divididos em

dois tipos: macrófagos M1 e M2 (BASTOS *et al.*, 2002; MILLS *et al.*, 2000; MOSSER, 2003).

Os macrófagos inflamatórios são ativados pela via clássica ou pela via alternativa. Classicamente, os macrófagos são ativados em resposta ao LPS, ou pela produção de fator de necrose tumoral (TNF), ou ainda, em resposta ao Interferon-gama (IFN- γ) em combinação com o TNF. Esta população de macrófagos apresenta uma maior capacidade microbicida, com uma alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), capazes de causar dano oxidativo aos agentes invasores (MOSSER, 2003), além da produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como a Interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-12 e o próprio TNF (BASTOS *et al.*, 2002; EDWARDS *et al.*, 2006; MANTOVANI *et al.*, 2004; MOSSER e EDWARDS, 2008).

Por sua vez, os macrófagos ativados pela via alternativa, são denominados de M2 e têm a habilidade de induzir, preferencialmente, a resposta imune adaptativa tipo 2, com características anti-inflamatórias (MOSSER, 2003). São recuperados de linhagens de camundongos BALB/c. Para serem ativados, estes macrófagos precisam da ligação com o receptor Fc γ Rs, ou tipo toll, ou CD40 ou CD44 (MILLIS *et al.*, 2000). Dessa forma, promovem a conversão da arginase em ornitina e ureia, apresentando como produto final o colágeno e a proliferação celular (BASTOS *et al.*, 2002; MILLIS *et al.*, 2000; MOSSER, 2003). Este tipo de macrófago falha em produzir grande quantidade de NO e ROS e são caracterizados pela produção de citocinas regulatórias, como IL-10 e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (BASTOS *et al.*, 2002; EDWARDS *et al.*, 2006; MANTOVANI *et al.*, 2004).

Os macrófagos dos camundongos C57BL/6 se caracterizam por apresentar uma resposta de perfil do tipo 1, com características inflamatórias, enquanto que os camundongos BALB/c se caracterizam por apresentar uma resposta do tipo 2, com e reparadoras.

O TNF é uma citocina produzida e liberada pelos macrófagos logo no início do processo inflamatório, e tem como funções, estimular o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e ativar as células endoteliais, bem como estimular a produção de quimiocinas que recrutam leucócitos e, induzir a apoptose de diversos tipos celulares (BORISH e STEINKE, 2003).

O TGF- β constitui uma família de moléculas codificadas por genes distintos. É responsável por inibir a ativação clássica dos macrófagos, de células endoteliais e

de neutrófilos. Participa do controle das respostas inflamatórias (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015) pois apresenta propriedades quimiotáticas para fibroblastos, bem como, estimula à síntese de colágeno, além de promover a angiogênese da região, afim de favorecer a homeostasia tecidual pulpar e periapical (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015; STASHENKO, TELES e D'SOUZA, 1998). Estas citocinas são peças-chaves de uma cascata que inicia, mantém e repara a inflamação e a reabsorção óssea periapical (MARTON e KISS, 2000).

Todavia, embora existam estudos que avaliaram a interação do cimento Endosequence BC[®] com outros tipos celulares, como fibroblastos gengivais (CANDEIRO *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2015) e monócitos e leucócitos polimorfonucleares (SOUZA *et al.*, 2019), ainda não há estudos que mensuraram o papel deste cimento quando incubados na presença dos macrófagos. Vários estudos na literatura demonstraram que o MTA é um material altamente biocompatível e que não alterou a resposta dos macrófagos inflamatórios (BRAGA *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2015; REZENDE *et al.*, 2005; REZENDE *et al.*, 2007). Para melhorar as propriedades físico químicas surgiram os cimentos biocerâmicos como Endosequence BC Sealer[®], Sealer Plus Bc[®] e Bio-C Sealer[®] e, embora existam estudos que avaliaram o papel do Endosequence BC Sealer[®] com outros tipos celulares, ainda não há estudos com os demais cimentos quando incubados na presença de células, assim, o objetivo deste estudo foi elucidar o comportamento destes cimentos biocerâmicos obturadores em relação ao MTA Angelus[®] nas funções efetoras dos macrófagos quanto à viabilidade, aderência, fagocitose e produção de metabólitos como ROS e NO, e das citocinas TNF- α e TGF- β em culturas de macrófagos murinos do tipo 1 e 2.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a resposta dos macrófagos inflamatórios murinos M1 e M2 após o contato com os cimentos biocerâmicos: Endosequence Bc[®] Sealer, Sealer Plus Bc[®] e do Bio-C Sealer[®] em relação ao MTA[®] branco (padrão- ouro).

Hipótese nula: Os cimentos biocerâmicos apresentam similaridade de resposta com o MTA em macrófagos inflamatórios de murinos.

Hipótese alternativa: Os cimentos biocerâmicos não apresentam similaridade de resposta com o MTA em macrófagos inflamatórios de murinos.

Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular dos macrófagos M1 e M2 após o contato com os cimentos biocerâmicos e o MTA®;
- Avaliar a capacidade de aderência dos macrófagos M1 e M2 após contato com os cimentos biocerâmicos e o MTA®;
- Avaliar a capacidade de fagocitose dos macrófagos M1 e M2 após contato com os cimentos biocerâmicos e o MTA®;
- Avaliar a produção de ROS e NO pelos macrófagos M1 e M2 após contato com os cimentos biocerâmicos e o MTA®.
- Avaliar a produção TNF- α e TGF- β pelos macrófagos M1 e M2 após contato com os cimentos biocerâmicos e o MTA®.

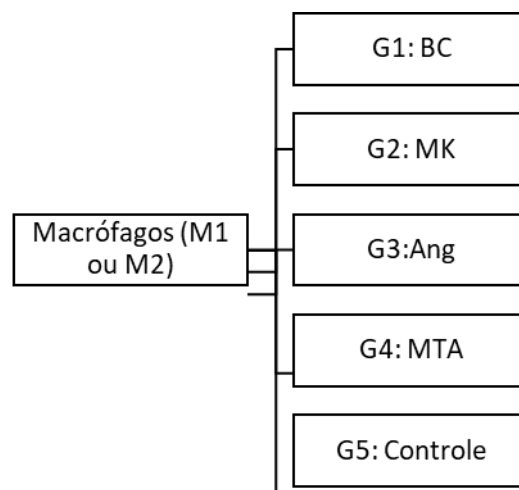
3 METODOLOGIA

Este estudo avaliou a atividade dos macrófagos inflamatórios de perfil pró-inflamatório (M1) e de perfil anti-inflamatório (M2) recuperados de duas linhagens de camundongos: C57BL/6 e BALB/c, respectivamente. Foram avaliados a viabilidade celular, a capacidade de aderência, de fagocitose, a produção de metabólitos ROS e NO, como também a produção de citocinas TNF e TFG- β .

A pesquisa foi realizada no laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Instituto de Ciências biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. A Comissão de ética e uso animal autorizou o protocolo destes experimentos (CEUA- UFMG 15/2018).

Foram constituídos cinco grupos experimentais para cada tipo de macrófago, de acordo com o cimento a ser utilizado:

- Grupo 1 - capilares contendo o cimento biocerâmico Endosequence BC Sealer[®] (BC) (Brasseler, Savannah, Geórgia, EUA)
- Grupo 2 - capilares contendo o cimento biocerâmico Sealer Plus Bc[®] (MK) (MK Life, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil)
- Grupo 3 - capilares contendo o cimento biocerâmico Bio-C Sealer[®] (Ang) (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil)
- Grupo 4 - capilares contendo o MTA[®] branco (MTA) (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil)
- Grupo 5 - capilares vazios (controle).



A composição, o fabricante e o lote de cada cimento utilizado está demonstrado no Quadro 1:

Quadro 1. Nome comercial, composição, fabricante, local de fabricação e lote dos materiais.

Nome comercial	Composição	Fabricante, local de fabricação	Lotes dos materiais
Endosequence Sealer®	BC óxido de zircônia, silicato de cálcio, fosfato de cálcio mono-básico, Hidróxido de cálcio, agentes radiopacificadores e espassantes	Brasseler, Savannah, Geórgia, EUA	16004SP
Sealer Plus Bc®	óxido de zircônia, silicato tricálcico, silicato dicálcico, hidróxido de cálcio, propilenoglicol	MK Life, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil	WR770100
Bio-C Sealer®	silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	131017 44409
MTA® branco	silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de bismuto	Angelus, Londrina, Paraná, Brasil	100395 100272

Elaborado pela autora, 2020.

3.1 Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais – CEBIO (Belo Horizonte, MG, Brasil) e foram utilizados somente fêmeas de quatro a oito semanas, mantidas em biotério com barreiras, em gaiolas apropriadas com 20cmx30cmx20cm, com controle de temperatura e luminosidade, ração e água *ad libitum*.

3.2 Preparo dos cimentos

Os cimentos foram preparados de acordo com a recomendação dos fabricantes em condições de esterilidade (fluxo laminar). Foram inseridos nas extremidades de tubos capilares, previamente cortados e esterilizados, que continham 3,52 mm² de diâmetro (Mícron, Trianon Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil); esta manobra permitiu um contato padronizado dos cimentos com a suspensão celular (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003). Os cimentos biocerâmicos já vêm pronto para uso e foram inseridos diretamente nas extremidades dos capilares através de suas pontas aplicadoras. O MTA foi espatulado e levado por meio de um Hollenback aos capilares. Em seguida, os capilares foram armazenados em placas de cultura estéreis (Nunclon™, Thermo Fisher Scientific, Dinamarca) até o momento do experimento, sendo colocados em contato com a suspensão celular sob a condição de cimentos frescos, sem terem tomado sua presa final. O grupo controle foi representado pelos capilares vazios.

3.3 Obtenção e cultura dos macrófagos peritoneais inflamatórios

Para a obtenção dos macrófagos inflamatórios, injetou-se na cavidade peritoneal dos camundongos 02mL de tioglicolato a 3% contendo 1% de ágar esterilizado (Biobras S.A.®, Montes Claros, MG, Brasil). Após quatro dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e em seguida, injetou-se, rapidamente, na cavidade peritoneal dos animais, 10mL de PBS 1X estéril, com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha de 21 guages. Removeu-se o maior conteúdo possível com a mesma seringa. As células foram centrifugadas a 350 rotações por minuto, à 4°C, durante dez minutos e o sobrenadante foi descartado;

depois foram ressuspensas em meio completo de RPMI 1640 (GIBCO BRL®, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), 0,1% de solução de β -mercaptoetanol (Sigma Chemical Co. Louis, EUA) a 0,05M, 0,2% de gentamicina, 200mM de L-glutamina (RPMI completo) e contadas por meio do microscópio em câmara de Neubauer; mais de 90% das células recuperadas tinham características morfológicas de macrófagos quando visualizadas por microscopia óptica (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

A concentração celular final foi ajustada de acordo com o ensaio proposto, que variou da seguinte forma: para a viabilidade celular, fagocitose e produção de ROS foram necessários 5×10^5 células; para a aderência celular, 1×10^6 células e, para os experimentos de detecção de NO, TNF e TGF- β , 2×10^6 células (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

3.4 Viabilidade Celular

O estudo da viabilidade celular dos macrófagos inflamatórios foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas através de dois métodos: pela exclusão por Azul de Tripán e pelo ensaio MTT *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*).

O azul de Tripán é um corante citotóxico que avalia a inabilidade da bomba de sódio e potássio das células, este, não é internalizado pelas células vivas, não sendo pois tingidas, enquanto as células mortas absorvem o corante e ficam de cor azulada quando observadas no microscópio. Para este ensaio foram utilizadas placas de cultura de 24 poços (Nunclon™). Adicionou-se aos poços 1 mL de suspensão celular na concentração de 5×10^5 juntamente com os capilares. As placas foram mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂, a 37°C, nos tempos propostos. Em seguida, acrescentou-se 100 μ L de solução de azul de Tripán (Sigma) em cada poço. A leitura foi realizada por meio do microscópio invertido. Foram contadas as células vivas e as mortas e os resultados foram expressos em porcentagem (BRAGA *et al.*, 2015; DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

O ensaio MTT *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) mensura a atividade mitocondrial celular, onde as células viáveis convertem o reagente MTT em um produto de coloração roxa. Utilizou-se placa de cultura de 96 poços (Nunclon™). Adicionou-se em cada poço 200 μ L de suspensão celular na

concentração de 5×10^5 células e os capilares pertencentes a cada grupo. As placas foram incubadas em estufa nos tempos supracitados. Em seguida, o poço foi lavado três vezes, com PBS 1X, os capilares removidos e acrescentou-se 100 μ L da solução de MTT (*3-[4,5 Dimethylthiazol-2-y-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Sigma). Incubaram-se, novamente, por mais três horas, em estufa à 37°C e adicionou 100 μ L de DMSO (dimetilsufóxido PA). A seguir, a leitura foi realizada em leitor de microplaca (PowerWave HT, BioTek, USA) (BRAGA *et al.*, 2014).

3.5 Aderência celular

A aderência dos macrófagos inflamatórios foi realizada em tubos de polipropileno estéreis (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra) nos quais foram adicionados 1 mL de suspensão celular contendo 1×10^6 células e os capilares. Logo em seguida, os tubos foram incubados por duas horas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, a 37°C. Posteriormente, os tubos foram levados ao vórtex por cinco segundos em baixa velocidade. Após a homogeneização, alíquotas de 20 μ L de cada tubo foram removidas e colocadas em câmaras de Neubauer (em triplicata). As alíquotas foram armazenadas em placas de petri, umidificadas com algodão, e embebidos em PBS 1X estéril. As placas de petri foram incubadas a 37°C, durante 18 horas. Em seguida, realizou-se a contagem pela micROScopia óptica de macrófagos aderentes e não aderente e, calculou-se a porcentagem de leveduras aderidas. (BRAGA *et al.*, 2015; LEE, WHYTE e HASLETT, 1993).

3.6 Fagocitose

Para o ensaio da fagocitose, utilizou-se a levedura *Saccharomyces boulardii* (Floratil[®], Merk S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) que foi ressuspensa em PBS 1x até se obter a concentração de 10^7 células/mL. As células foram mortas pelo calor, em autoclave a 100°C, durante dez minutos. Foram armazenadas sob refrigeração até o momento do experimento (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

Foram utilizadas placas de cultura de 24 poços (Nunclon[™]) e, em cada poço foi colocado uma lamínula redonda estéril, (GlassTécnica Importação e Comércio de Vidros, São Paulo, SP, Brasil), sobre as quais foram depositadas 200 μ L de suspensão celular contendo 5×10^5 células em meio completo; as placas foram

incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, durante duas horas. Posteriormente, o meio foi removido, as células lavadas uma vez com RPMI 1640 sem fenol vermelho, a 37°C e, acrescentado aos poços, 1 mL deste meio, os capilares e 10µL da suspensão de *S. boulardii*. A placa foi então incubada por uma hora em estufa.

Após esse período, as leveduras não ligadas foram delicadamente removidas, após três lavagens com o meio de RPMI 1640 sem fenol. As lamínulas foram cobertas com 1 mL de ácido tânico a 1% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, São Paulo, Brasil) diluído em água destilada, durante dez minutos, o que possibilitou a distinção entre as leveduras extracelulares (coloração azul escuro a roxo) e as intracelulares (coloração rosa a azul clara). Foi realizado uma nova lavagem, colocando-se sobre cada lamínula uma gota de soro fetal bovino para que fosse evitado a cristalização do corante. Em seguida, todo o líquido do poço foi removido e lavado com água deionizada. As lamínulas foram então coradas com Panótico rápido (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, Paraná, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Removeu-se cuidadosamente as lamínulas, colocando-as para secar. A seguir, foram coladas em lâminas (Kasvi, Curitiba, Brasil), com Entellan (MERK KGaA Darmstadt, Alemanha), e analisadas ao micROScópio sob imersão, em um aumento de 100X (GIAIMIS *et al.*,1992). Foi realizada a contagem de 100 macrófagos por lamínula, dentre os quais foi contado o número de leveduras aderidas (roxas) e as leveduras fagocitadas (cor ROSa). Fez-se a médias das leveduras fagocitadas, dividindo-se pelo número total de leveduras (aderidas e fagocitadas) multiplicado por 100.

3.7 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para avaliar a produção de ROS pelos macrófagos utilizou-se uma concentração de 5×10^5 células. Esta produção foi mensurada imediatamente após o contato da suspensão celular com os capilares. Utilizou-se uma placa opaca de 96 poços e, em metade das amostras, foi colocado 50 µL de Zimosan A na concentração de 10^7 partículas/mL (parte da levedura *Saccharomyces cerevisiae*), 130 µL de suspensão celular e 20 µL de luminol; nos poços sem estímulo, foram colocados 180 µL de suspensão celular e 20 µL de luminol. Em seguida foi realizado a leitura no Lumicount™ (Packard Bioscience Company, Inc, Downers Grove, IL, EUA)

3.8 Produção de óxido nítrico (NO)

Para avaliar a produção de nitritos foi utilizado o sobrenadante de cultura de 2×10^6 células, de 72 horas, estimulada em metade da placa com 50 unidades (U) de IFN- γ recombinante (Pharmingem). 50 μ L do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (estimulado e não estimulado), acrescentando-se 50 μ L de RPMI 1640 sem fenol vermelho aos poços. Em seguida, foi acrescentado 100 μ L de solução estoque de NaNO₂ a 100 μ L, previamente diluídos 1:200 nos primeiros poços da curva padrão. Foram realizadas diluições sucessivas de 1:2 nos poços seguintes, adicionando-se 100 μ L de uma mistura de sulfanilida, a 1% em ácido fosfórico 2,5%, e nafitiletenodiamida 1%, em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente foi realizado a leitura em leitor de microplacas a 540 nanômetros (nm). A quantidade de nitrito foi calculada utilizando uma curva padrão de nitrito de sódio de 125 μ M (micrômetros) a 0,977 μ M, com sensibilidade de 0,5 μ M (BRAGA *et al.*, 2014; GREEN *et al.*, 1982; REZENDE *et al.*, 2007).

3.9 Produção de TNF- α e TGF- β por ELISA (Ensaio imunoenzimático)

Para a avaliação da produção de citocinas, utilizou-se sobrenadantes da cultura na concentração de 2×10^6 células presentes em placas de 24 poços, onde foram adicionados os capilares e os estímulos, de acordo com a citocina testada. Para TNF, metade da placa foi estimulada com 50 U de IFN- γ recombinante (Pharmingem, San Diego, CA., EUA) (incubação de 24h em estufa) e utilizou-se o kit de ELISA (B&D Industrial, Macon, Ga, EUA), de acordo com a orientação do fabricante.

Para a detecção de TGF- β metade da placa foi estimulada com 50 μ L de LPS e o sobrenadante foi recolhido após 72 horas de incubação; utilizou-se o kit R&D Systems (R&D Systems, Mineapolis, MN, EUA). A leitura foi realizada em leitor de microplacas.

3.10 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pela presença ou não da normalidade. Para os ensaios de viabilidade, aderência, fagocitose, produção de ROS, NO, TNF, houve distribuição normal entre os grupos. Utilizou-se o teste paramétrico ANOVA e o teste Tukey, e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para o ensaio de detecção TGF- β não houve normalidade, utilizando-se o teste de Kruskal Wallis considerando-se significativo quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas pelo programa Graphpad Prism 7.04.

4 RESULTADOS

Artigo científico submetido à revista *International Endodontic Journal*, nas normas da revista: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/13652591>

Evaluation of bioceramic cements in the activity of macrophages

Layara Cristine Tomaz Tavares, Betânia Canal Vasconcellos, Danilo Couto da Silva, Leonardo Gomes Vaz, Leda Quércia Vieira, Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Warley Luciano Fonseca Tavares

Objective: Evaluate the influence of endodontic bioceramic cements on the cellular activity of inflammatory macrophages.

Methods: Murine peritoneal macrophages, M1 and M2, obtained from C57BL / 6 and BALB / c mice, respectively, were cultured with capillaries containing or not Endosequence BC Sealer[®] (BC), Sealer Plus BC[®] (MK), Bio C Sealer[®] (Ang) and MTA[®]. Cell viability was measured by trypan blue and MTT methods at 24, 48 and 72 hours. Cell adhesion, phagocytosis of *S. boulardii*, production of metabolites, such as reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), and cytokines production of TNF and TGF- β , were also evaluated. The data were analyzed using the ANOVA test ($p < 0.05$).

Results: Cell viability assayed by MTT method was similar between bioceramics and MTA all over the experimental time ($p > 0.05$). There was a significant difference ($p < 0.05$) between BC and control (72h) for M2 cells by the trypan blue cell viability method. There was no statistical difference between both macrophages when adherence and phagocytose were assayed. Concerning ROS'production, the sealer MK induced higher production than the control group, Ang and MTA for M1 ($p < 0.05$), in the presence of zymosan A. Bioceramic cement induced a higher production of ROS in M1 cells compared to M2 ($p < 0.001$). When compared to control cells, all treated groups showed lower NO production, for both macrophages. No statistical differences were observed between M1 and M2 cells. The M1 production of TNF was higher than M2 when cells were cultured with the MK or in control groups when cells were not stimulated with IFN- γ . Whereas, in the presence of IFN- γ , the TNF

production was higher in cultures stimulated with BC. The production of TGF- β was similar for both macrophages, in the presence or absence of the tested types of cement.

Conclusion: As bioceramic types of cement present similar composition of MTA, similar macrophages responses were observed between them. This study demonstrated the effective biocompatibility of bioceramic types of cement.

Keywords: macrophages, mineral trioxide aggregate, cytotoxicity, bioceramic cement.

Introduction

The repair process of periradicular tissues depends, among other factors, on the physical-chemical and biological properties of the root canal sealers (De Oliveira Mendes *et al.* 2003, Murray *et al.* 2007). The mineral trioxide aggregate (MTA[®] - Angelus, Londrina, Paraná, Brazil) has been used frequently, presenting satisfactory clinical and laboratory results (Rezende *et al.* 2005). MTA is a biocompatible, bioactive, and hydrophilic material (Rezende *et al.* 2005, Rezende *et al.* 2007, Koch & Brave 2012, Liu *et al.* 2015, Braga *et al.* 2015) indicated mainly for the treatment of internal and external resorption, sealing of perforations, apexification and retro-obturations (Torabinejad & Chivian, 1999, Bogen & Kuttler, 2009). However, characteristics such as sandy consistency, lack of flow and the difficulty of insertion and removal, especially in curved canals (Bogen & Kuttler, 2009), restrict the use of this material as root canal sealer. In order to reverse these limitations, bioceramic cement composed of silicates, particles similar to those found in the MTA, have been recently developed, presenting physicochemical properties that allow their use in the filling of the Root Canal System (RCS) (Borges *et al.* 2012).

The Endosequence BC[®] (Brasseler, Savannah, Georgia, USA), a silicate-based sealer, has excellent adhesion to dentinal walls (Koch & Brave 2012, Huang *et al.* 2018) high release of calcium ions and antimicrobial capacity, in addition to osteoinductive properties (Zamparini *et al.* 2019) and biocompatibility when incubated in the presence of gingival fibroblasts (Candeiro *et al.* 2016) and pulp stem cells (Chen *et al.* 2016). New bioceramic materials, with formulations similar to Endosequence BC[®], were introduced to the market, such as Sealer Plus Bc[®] (MK

Life, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) and Bio-C[®] Sealer (Angelus, Londrina, Paraná, Brazil).

The filling materials, although contained within the RCS, interact directly with the surrounding tissues through the apical foramen and accessory communications (Bernath & Szabo, 2003, Chen *et al.* 2016). Thus, its properties and compositions can influence the immunoinflammatory reactions that occur in the periradicular region after its use (Bernath & Szabo, 2003).

Macrophages are present in the inflammatory infiltrate (16) and participate in the modulation of the periapical immune response (De Oliveira Mendes *et al.* 2003, Rezende *et al.* 2005, Rezende *et al.* 2007, Braga *et al.* 2014, Braga *et al.* 2015) These cells are classified into subtypes, such as M1 and M2 macrophages (Bastos *et al.* 2002, Rezende *et al.* 2005). Classically, type 1 (M1) macrophages are activated in response to LPS, to the presence of tumour necrosis factor (TNF), or even in response to Interferon-gamma (IFN- γ) in combination with TNF- α . Such cells have a greater phagocytic capacity, producing high levels of reactive oxygen species (ROS) that promote the elimination of aggressive agents; in addition to favouring the activation of responses by Th1 lymphocytes (Bastos *et al.* 2002, Rezende *et al.* 2005).

Type 2 (M2) macrophages are activated by the alternative route, promoting, during arginine metabolism, the conversion of arginase into ornithine and urea, with collagen and cell proliferation as the final product (Mills *et al.* 2000, Bastos *et al.* 2002). Such cells fail to produce large amounts of ROS and NO and favour the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β (Bastos *et al.* 2002, Rezende *et al.* 2007). They are essential in the healing process and in modulating the inflammatory response. The macrophage polarization refers to a perturbation of macrophages with exogenous agents. Usually, in face of pathogens and inflammatory agents, macrophages of C57BL/6 present a high levels of NO and ROS and, seems the classical M1 macrophages, because of this, in this study we called the C57BL/6 macrophages of M1. Due the fact of Balb/c mice present high activity of arginase and, consequently, high production of polyamines in face of pathogens and inflammatory agents, we also called Balb/c macrophages of M2 (Murray *et al.* 2014).

This study evaluated cell viability, adherence, phagocytic capacity, and the production of ROS, NO, TNF and TGF- β in cultures of M1 and M2 macrophages, in

the presence of bioceramic cements; Endosequence BC Sealer[®], Sealer Plus BC[®] and Bio-C Sealer[®], comparing these responses with those promoted by MTA[®].

Materials and methods

Female C57BL / 6 (M1) and BALB / c (M2) mice, from 4 to 8 weeks of age, were obtained from CEBIO (UFMG, Belo Horizonte) and kept in cages with barriers, temperature and light control, with water and food *ad libitum*. The animal ethics committee authorized the protocol for these experiments (CEUA-UFMG 15/2018).

To culture inflammatory macrophages, 2 mL of 3% thioglycolate containing 1% sterile agar (Biobras S.A[®], Montes Claros, MG, Brazil) was injected into the peritoneal cavity of the mice. After four days, the animals were sacrificed, and 10mL of sterile buffer solution was injected into the peritoneal cavity and, with the aid of a syringe, the highest cell content was removed. Then, the cells were centrifuged, resuspended and counted under optical microscopy in a Neubauer chamber (Braga *et al.* 2014). Cell concentration was adjusted for: cell viability, phagocytosis and production of ROS, 5×10^5 cells, for cell adherence, 1×10^6 cells (1) and the measurement of cytokines and NO, 2×10^6 cells (Rezende *et al.* 2005, Braga *et al.* 2014). The Endosequence BC Sealer[®] (BC), Sealer Plus Bc[®] (MK) and Bio-C Sealer[®] (Ang) cement were placed directly on the ends of sterile capillaries for contact with the cell suspension (De Oliveira Mendes *et al.* 2003). MTA was manipulated according to the manufacturer and then inserted into the capillaries; empty capillaries served as a control group.

Cell Viability

The study of cell viability was carried out at 24, 48 and 72 hours using the MTT assay, and excluding trypan blue. For MTT, 96-well culture plates were used, and 200 μ L of cell suspension and capillaries belonging to each group (in triplicate) were added. The plates were incubated in a CO₂ oven at times mentioned above. Then, the wells were washed, the capillaries were removed, and the MTT solution was added (3- [4,5 Dimethylthiazol-2-y-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). The reading was performed in a microplate reader (Bio-Rad, 2550, Hercules, USA) (Braga *et al.* 2014).

For the Trypan blue exclusion method, 24-well culture plates were used, and the cell suspension and capillaries were added. The plates were kept in an oven until the proposed times, and then 100µL of Trypan blue solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was added. The reading of the presence of live and dead cells was performed using an inverted microscopy and was expressed as a percentage of live macrophages (De Oliveira Mendes *et al.*, 2010; Braga *et al.* 2015).

Adherence

Cell adhesion was performed in sterile polypropylene tubes in which the cell suspension and capillaries were added. The tubes were incubated and vortexed at low speed. 20µL aliquots from each tube were removed and placed in Newbauer chambers (in triplicate); these were stored in Petri dishes moistened with cotton soaked in sterile 1X PBS; and, incubated at 37 ° C for 18 hours. Then, the counting of macrophages adherent or not in optical microscopy was performed. The percentage of adhered cells was obtained according to a previous methodology (Lee *et al.* 1993).

Phagocytosis

24-well culture plates were used, and a sterile round coverslip was placed in each well (triplicate) on which 200µL of cell suspension were deposited. Then, the plates were incubated, the wells were washed and RPMI 1640 without phenol, capillaries and 10µL of the suspension of *S. boulardii* at a concentration of 10^7 cells / mL were added (Floratil®; Merck SA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The plate was incubated again, the wells washed, and 1 mL of 1% tannic acid was added over the coverslips (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, São Paulo, Brazil), which were later stained with Rapid Panotic (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda) according to the manufacturer's instructions (De Oliveira Mendes *et al.* 2003; Braga *et al.* 2015). The coverslips were analysed under the optical microscope under immersion, in a magnification of 100X. One hundred macrophages were counted, of which the percentage of phagocytosed yeasts was made.

Production of ROS

An opaque 96-well plate was used during the experiments to determine the production of ROS, on which the capillaries were placed, and the cell suspension

resuspended in RPMI without phenol. In half of the samples, 50 μL of Zymosan A was placed, at a concentration of 10^7 particles / mL, 130 μL of cell suspension and 20 μL of luminol; in the wells without stimulation, 180 μL of cell suspension and 20 μL of luminol were placed. Then, the reading was performed at LumicountTM (Packard Bioscience Company, Inc, Downers Grove, IL, USA) (Braga *et al.* 2014).

Production of nitric oxide (NO)

The 72-hour culture supernatant containing the cell suspension of 2×10^6 cells stimulated with 50 units (U) of recombinant IFN- γ (Pharmingem) was used. It was transferred to a 96-well plate 50 μL of the supernatant (stimulated and not stimulated) and added 50 μL of RPMI 1640 without red phenol to the wells. Then, 100 μL of 100 μL NaNO₂ stock solution was added, previously diluted 1: 200 in the first wells of the standard curve. Successive 1: 2 dilutions were performed in the following wells. Finally, 100 μL of a mixture of 1% sulfanilamide in 2.5% phosphoric acid and 1% naphthylethylenediamide in 2.5% phosphoric acid were added, in the proportion of 1: 1. After 10 minutes of incubation at room temperature, reading on a microplate reader at 540 nanometers (nm) was performed. The amount of nitrite was calculated using a standard sodium nitrite curve from 125 μM (micrometres) to 0.977 μM , with sensitivity: 0.5 μM .

TNF and TGF- β production analyzed by ELISA

The volume of 01 mL of cell suspension containing 2×10^6 cells was placed in a 24-well plate (NunclonTM). The appropriate capillaries from the experimental groups and the stimuli were added and subsequently placed in a CO₂ oven at 37 ° C so that the supernatants of the cultures were collected in due time.

For TNF part of the samples was stimulated with 50U of recombinant IFN- γ (Pharmingem, San Diego, CA., USA) and then incubated for 24 hours. After this time, the culture supernatant was collected. The ELISA kit was used according to the manufacturer's guidance B&D Systems (B&D Industrial, Macon, Ga, USA).

For the TGF- β detection assays, half the plate was plated with 50 μL of LPS and the supernatant was collected after 72 hours of incubation; the R&D Systems kit

(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used. The reading was performed in a microplate reader.

Statistical analysis

The results were analysed using the Graphpad Prism 7.04 program, in which the ANOVA variance test (multiple comparisons) was used, and the proposed analyses were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Cell viability

Cell viability by MTT is shown in Figure 1 (a, b). For the M1 macrophages (a), the Ang cement showed less cell viability than the control, within 24 hours ($p < 0.05$); in 48h there was a significant difference between BC and MK when compared to the control ($p < 0.05$) (Fig. 1.a). For the M2 macrophages (b), the MK cement showed less viability to the control, in the time of 24h ($p < 0.05$); at 48h, only Ang showed statistical difference to the control; and, at 72 hours, there was less viability for BC, Ang and MTA, compared to the control group ($p < 0.05$). (Fig. 1.b).

Cell viability by excluding Trypan blue is shown in Figure 1 (c, d). For the M1 macrophages, there was no statistical difference between the groups evaluated, in any of the tested times (Fig. 1.c). For M2 macrophages, there was a significant difference between BC and control in 72h ($p < 0.05$) (Fig. 1.d).

There was no difference in cell viability tests between bioceramic cement and MTA for both types of macrophages tested.

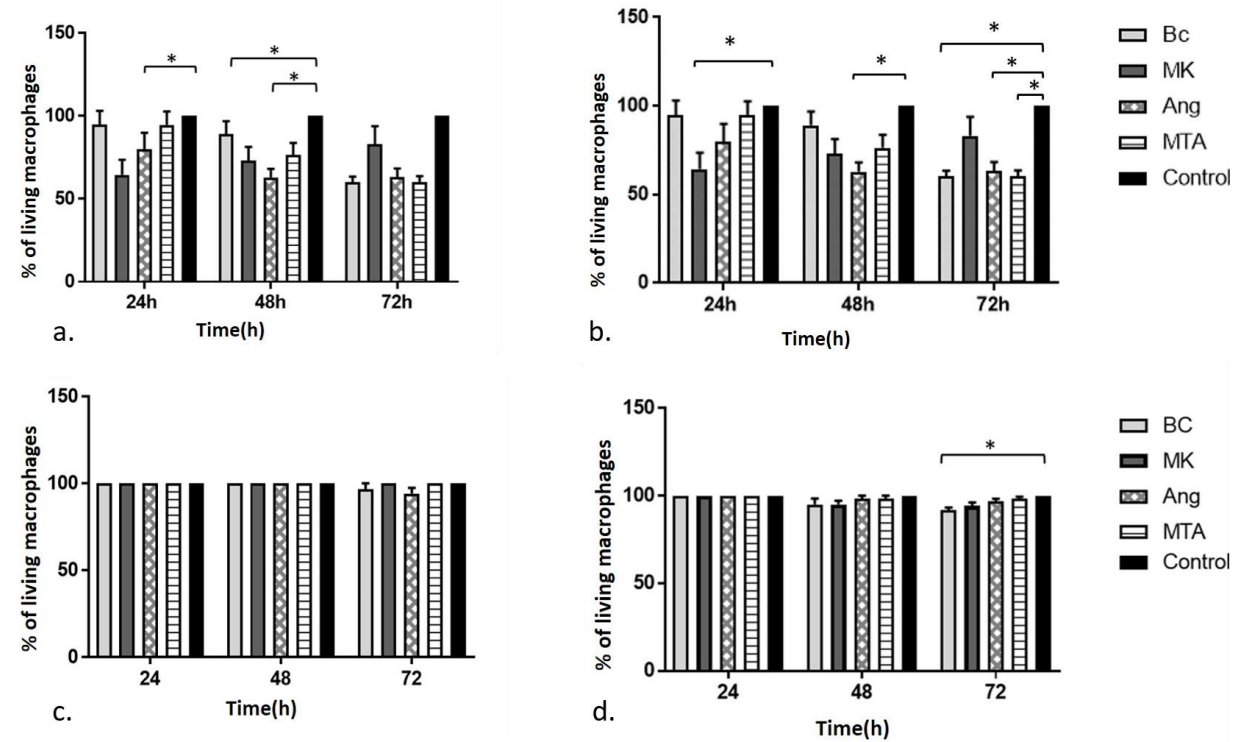


Figure 1- Percentage of macrophages M1 (a) and M2 (b) after MTT Cell viability assay with capillaries containing the bioceramics, MTA and control group. (*) indicates a statistical difference between groups ($p < 0.05$). Percentage of macrophages M1 (c) e M2 (d) after Cell viability assay with Trypan blue exclusion method, after direct contact with bioceramics, MTA and control in the intervals of 24, 48 and 72hours (*) indicates a statistical difference between groups ($p < 0.05$). Imagem elaborada pela autora (2020).

Cell Adherence Assay and Phagocytosis

The results of cell adhesion and the *S. boulardii* phagocytosis assay of M1 and M2 macrophages demonstrated the absence of statistically significant difference in the percentage of adhered cells and phagocytosed yeasts for both types of macrophages for the groups evaluated ($p < 0.05$). (Figure 2)

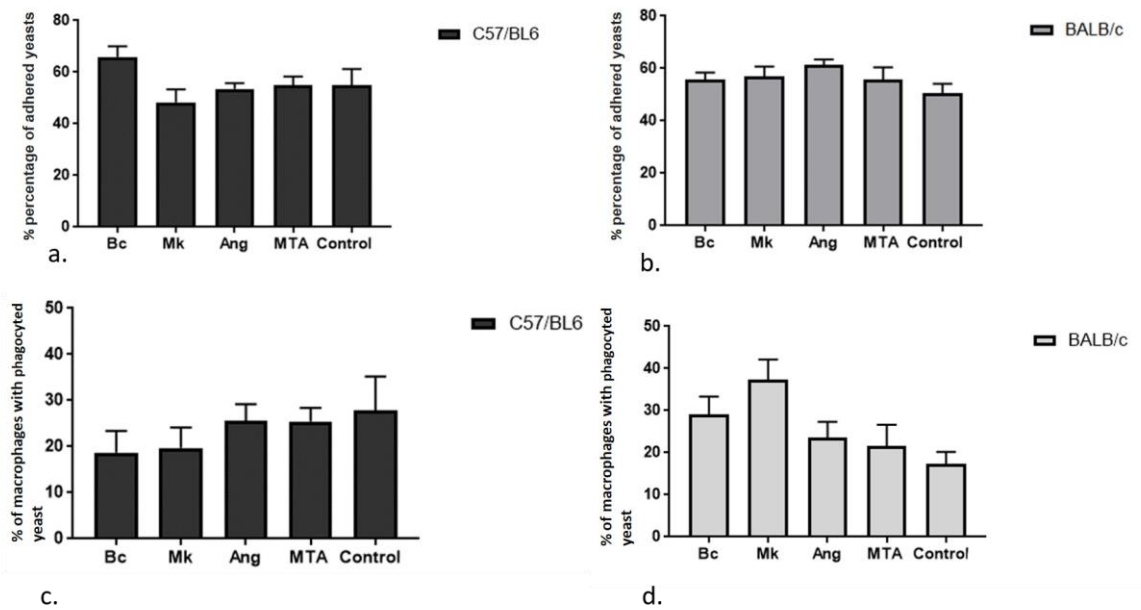


Figure 2: Percentage of adhered cells of M1 (a) and macrophages of M2 (b) after the adherence assay with capillaries containing the bioceramics, MTA and control group. Percentage of yeasts phagocytosed by macrophages M1 (c) and M2 (d), after the phagocytosis assay with capillaries containing the sealers and control. For both assays, there was no significant difference between the different groups tested in both cell types. Imagem elaborada pela autora(2020).

Production of metabolites

The production of ROS by M1 macrophages is shown in Figure 3 (a). The presence of Zymosan A (positive control) significantly stimulated the higher production of ROS by macrophages; for M1, MK cement provided higher production to Ang, MTA and control cement ($p < 0.05$). In turn, the BC induced significant production to the control ($p < 0.05$) (Fig 3.a). There was no significant difference for M2 (Figure 3 b.) for bioceramics and MTA in the presence or absence of Zymosan. When comparing M1 and M2 in the presence of the stimulus, there was a higher production of ROS for M1 compared to M2 for BC ($p = 0.0487$), MK ($p = 0.0016$) and Ang ($p = 0.0170$).

The production of nitric oxide by macrophages M1 and M2 is illustrated in Figure 3 (c, d), respectively. It is noted that, for both macrophages, in the absence of IFN- γ , there was no statistical difference, especially for M1 in the presence of the stimulus. There was no difference in this production when comparing the two types of macrophages ($p < 0.05$).

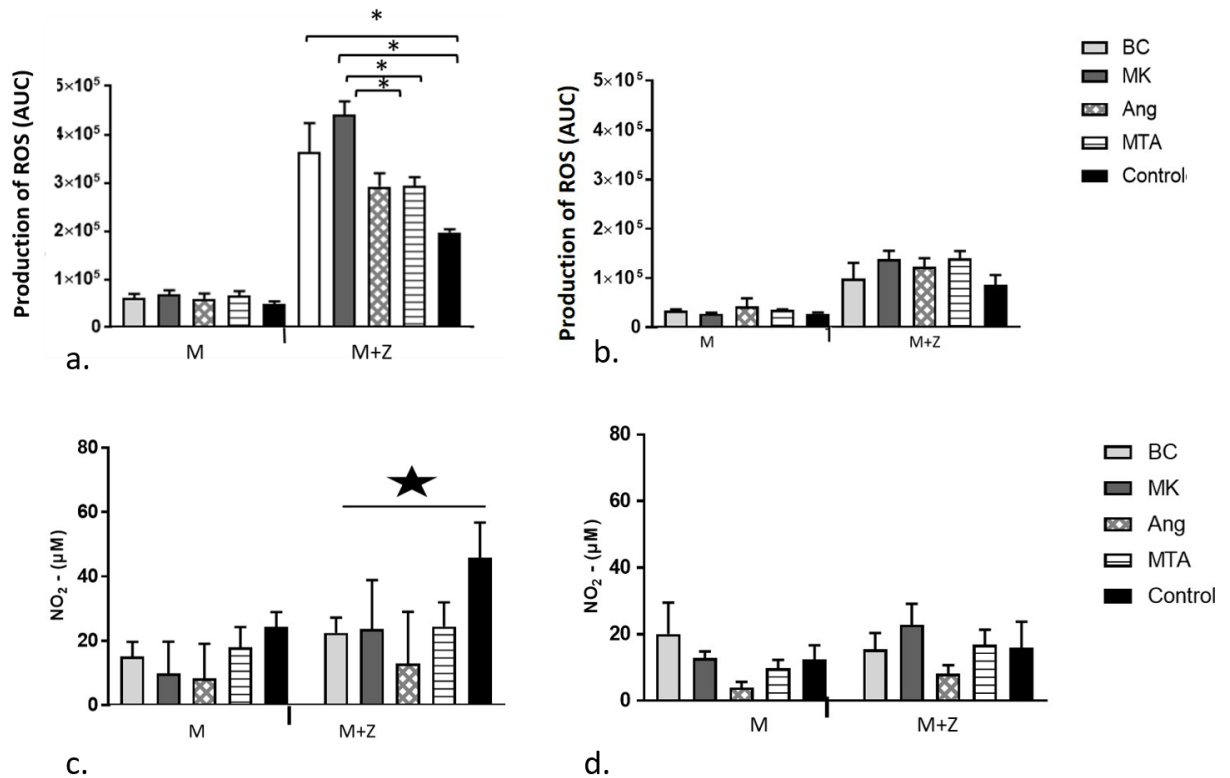


Figure 3. Mean of the luminescence expressed by the area under the curve of the ROS' production by macrophages M1 (a) and M2 (b) after contact with capillaries. M indicates cultures of macrophages in the presence of capillaries containing or not the sealers; M + Z indicates cultures of macrophages in the capillaries with Zimosan A. (*) indicates the statistical difference between groups ($p < 0.05$). Production of nitric oxide by macrophages M1 (c) and M2 (d) with capillaries containing bioceramics, MTA and control group, in the presence or absence of a stimulus (M= macrophages and M+IFN= macrophages + Interferon Gamma). (★) indicates a statistical difference between all sealers tested with the control group ($p < 0.05$). Imagem elaborada pela autora (2020).

Production of cytokines

The production of TNF by macrophages M1 and M2 is illustrated in Figure 4 (a, b), respectively. For M1 macrophages, in the absence of IFN- γ , the group treated with BC showed higher production than the others. In the presence of the stimulus, the BC presented higher production to MK and Ang cement. Besides, all treated groups presented less production than the control (Figure 4 a.). For M2, there was no statistical difference in the presence or absence of stimulus for all groups tested (Fig 4. b). When comparing M1 and M2, we observed that M1 produced more TNF in the absence of stimulus for the control ($p < 0.0001$) and MK ($p = 0.0432$) groups, and when stimulated, BC produced more in M1 than in M2 ($p < 0.0001$).

The production of TGF- β by macrophages M1 and M2 is illustrated in Figure 4 (c, d), respectively. No statistical difference was found for both macrophages tested for all tested cement, in the presence or absence of the stimulus.

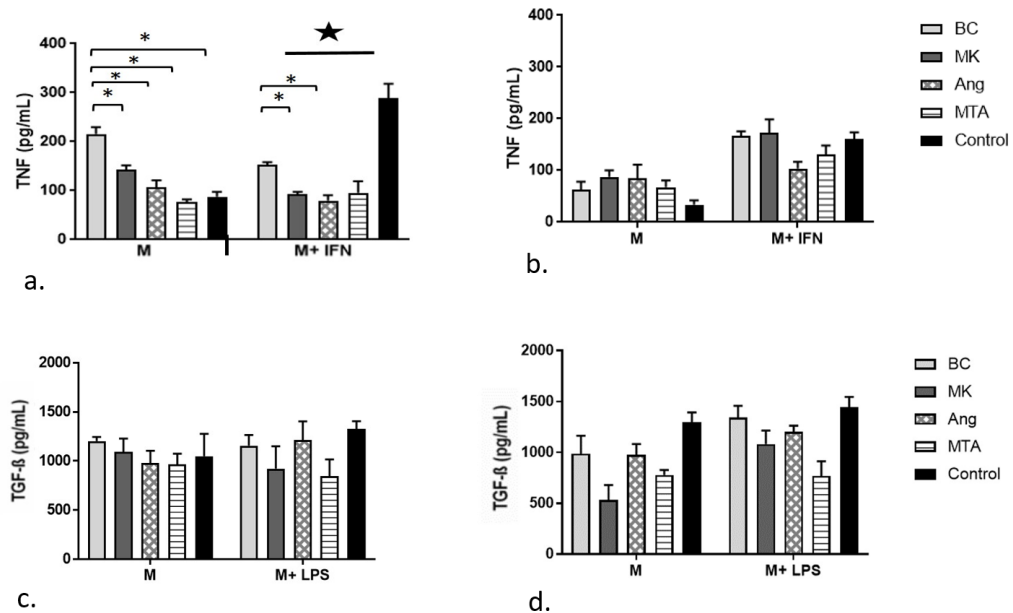


Figure 4. Production of TNF by macrophages M1 (a) and M2 (b), after the presence of a stimulus (macrophages and Interferon Gamma -M+IFN) or only macrophages (M) with capillaries containing bioceramics, MTA and control group. (*) indicates a statistical difference between groups, and (★) indicates a statistical difference between all the tested sealers and the control group ($p < 0.05$). Production of TGF- β by macrophages M1 (c) and M2 (d), after the presence of a stimulus (macrophages and Lipopolysaccharide -M+LPS) or only macrophages (M) with capillaries containing bioceramics, MTA and control group. No significant difference was found between the groups for both macrophages subtypes. Imagem elaborada pela autora (2020).

Discussion

Macrophages are cells that play a fundamental role in phagocytosis and pathogen elimination, in the stimulation and activation of cells such as polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes, as well as in tissue repair processes (Fujiwara & Kobayashi, 2005). In this study, two lines of macrophages were evaluated, activated by the classic (M1) and the alternative route (M2), stimulated or not with bioceramic agents. These two cell subtypes have different purposes that, in balance, are essential for the periapical immune response (De Oliveira Mendes *et al.* 2003; Rezende *et al.* 2005; Rezende *et al.* 2007; Braga *et al.* 2015). While M1 macrophages play a significant role in protecting against pathogens internalized by phagocytosis, M2 macrophages promote the cleaning of possible

debris, presenting an anti-inflammatory role, involved in healing processes (Mills *et al.* 2000, Bastos *et al.* 2002, De Oliveira Mendes *et al.* 2003; Rezende *et al.* 2007).

The materials used to fill the RCS favour the healing of periradicular tissues (Almeida *et al.* 2019). It is known that the periapical inflammatory response is not only the result of the direct action of microorganisms but also, the release of inflammatory mediators in the region (Stashenko *et al.* 1998).

Some studies have evaluated the role of filling materials on macrophage activity (De Oliveira Mendes *et al.* 2003, Santos *et al.* 2019), as well as MTA (Rezende *et al.* 2005, Rezende *et al.* 2007, Braga *et al.* 2014, Braga *et al.* 2015) bioceramic cement has been presented as a new class of filling cement (Candeiro *et al.* 2016, Loushine *et al.* 2011, Borges *et al.* 2012, Souza *et al.* 2019), seeking to compensate for the lack of flow and the difficulty of inserting and removing the MTA. In this work, no significant differences were found between bioceramics and MTA for both tested viability methods. However, differences were found between bioceramic cement and control that may be related to their different compositions and setting times, capable of influencing the release of their by-products (Han & Okiji, 2013).

The presence of moisture in experimental conditions may have influenced MTT viability in M1 macrophage cultures, since it favours higher release of ionic components from bioceramics, favouring better biocompatibility (Elyassi *et al.* 2019). In osteoblast cultures, BC showed high levels of cytotoxicity in 24-hour cultures, followed by a slight reduction only after 06 weeks of contact with these cells (Loushine *et al.* 2011). Regarding cell viability using the trypan blue method, in line with previous studies, the MTA did not interfere with the viability of macrophages (Rezende *et al.* 2007, Braga *et al.* 2015) except for 72 hours in contact with M2 cells. This finding, however, may be due to the lack of nutrients in the environment after this incubation time (Rezende *et al.* 2007).

Firstly, macrophages need to adhere in order to subsequently phagocyte (Fujiwara & Kobayashi, 2005). None of the tested materials interfered with cell adhesion, demonstrating biocompatible characteristics of these types of cement. Similar results were observed for the MTA (Rezende *et al.* 2007, Braga *et al.* 2014, Braga *et al.* 2015).

Since filling cement can come into contact with macrophages and, sometimes, in the presence of infection, they must not interfere with their phagocytic capacity (Rezende *et al.* 2005). In previous studies using MTA, a greater number of yeasts

phagocytosed by M2 cells was found when compared to M1 (Rezende *et al.* 2007). In this work, there was no difference when comparing the M1 and M2 macrophages. Conversely, it was demonstrated that when macrophage cultures were put in contact with MTA Fillapex[®], an inhibition of phagocytosis occurred in both macrophage types (Braga *et al.* 2015). In turn, when in contact with zinc oxide and eugenol, M2 macrophages had their phagocytic capacity inhibited (De Oliveira Mendes *et al.* 2003).

After the phagocytosis process, a chemical attack on the pathogen will occur in the phagosome with the release of reactive oxygen and nitric oxide species (Rezende *et al.* 2005). In this study, M1 cultures promoted a higher production of ROS in the presence of Zymosan, MK induced significant production to the other types of cement, which may be an essential factor in the elimination of residual pathogens. Previously, it was demonstrated that MTA[®] did not change the production of ROS under the conditions tested (Rezende *et al.* 2007). In turn, in other studies, lower production of ROS was observed in cultures treated with MTA[®] compared to control, when stimulated with Zimosan (Braga *et al.* 2014). ROS concentrations can also signal other paths besides those involved in its microbicidal activity (Yang *et al.* 2013). Of great interest in endodontics are its effects on osteoclastic differentiation, mediating the expression of RANK (Sasaki *et al.* 2009, Yang *et al.* 2013) involved in periapical bone resorption. There was no significant difference in the production of ROS by M2 in cultures stimulated with cement, in the presence or absence of Zimosan, similar to that previously demonstrated to MTA (Rezende *et al.* 2007, Braga *et al.* 2014).

Nitric oxide can easily cross membranes and destroy the microbial cell, or function as an intercellular messenger, interfering with vasodilation and the processes of blood coagulation (Brennan *et al.* 2003). All the types of cement evaluated here, in the presence of the stimulus, showed a significant reduction in NO production compared to the control ($p < 0.05$), suggesting that, in the absence of infection, bioceramics and MTA do not interfere with NO production. Previous studies have shown that, in the presence of IFN- γ , there was an increase in NO production (Brennan *et al.* 2003, Rezende *et al.* 2007, De Oliveira Mendes *et al.* 2010). In turn, MTA did not interfere in this production (Rezende *et al.* 2007, Braga *et al.* 2014) while MTA Fillapex[®] inhibited it (Braga *et al.* 2014).

Macrophages produce several cytokines that direct, perpetuate and inhibit the immune response. TNF is a cytokine produced and released at the beginning of the inflammatory process. It has the function to stimulate the recruitment of neutrophils, the production of chemokines, activate endothelial cells, indirectly induce osteoclast activation, as well as induce apoptosis of several cell types (Stashenko & Teles, 1998). In this work, higher production of TNF by macrophages M1 was observed to M2 in the presence of BC cement ($p < 0.0001$), as demonstrated elsewhere (Rezende *et al.* 2005).

Conversely, the M2 macrophages have been shown to produce higher levels of TNF than M1 (Braga *et al.*, 2014). In the presence of M2 cells, TNF production was reduced when incubated with Pulp Canal Sealer EWT® and Endofill® (De Oliveira Mendes *et al.* 2010). Here, MTA did not alter TNF production in both macrophage subtypes, as previously demonstrated (Rezende *et al.* 2003; Braga *et al.* 2014). BC cement showed significant production even in the absence of the stimulus, and when stimulated, it produced more TNF to other bioceramic types of cement. In contrast, this cement, when placed in the presence of monocytes, did not interfere with the production of TNF (Souza *et al.* 2019) nor even with the production of other pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 in fibroblast cultures (Da Silva *et al.* 2017).

Conclusions

The results of this study demonstrate the effectiveness of bioceramics as filling cement, as they do not interfere with cell adhesion, phagocytic capacity, as well as NO and TGF- β production. In turn, such filling types of cement stimulated the production of ROS by M1 macrophages, favouring the elimination of residual pathogens after the cleaning and formatting procedures of the SCR.

References

1. Almeida LH, Gomes APN, Gastmann AH *et al.* (2019) Bone tissue response to an MTA-based endodontic sealer, and the effect of the addition of calcium aluminate and silver particles. *International Endodontic Journal* **52**, 1446-56.
2. Bastos KRB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR (2002) Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *Journal of Leukocyte Biology* **71**, 271-8.
3. Bernath M, Szabo J (2003) Tissue reaction initiated by different sealers. *International Endodontic Journal* **36**, 256-61.

4. Braga JM, Oliveira RR, Martins RC, Ribeiro Sobrinho AP (2014) 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* **47**, 909-19.
5. Braga JM, Oliveira RR, de Castro Martins R, Vieira LQ, Sobrinho APR (2015) Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. *Dental Traumatology* **31**, 390-5.
6. Bogen G, Kuttler S (2009) Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *Journal of Endodontics* **35**, 777-90.
7. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA *et al.* (2012) Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International Endodontic Journal* **45**, 419-28.
8. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD (2003) The role of nitric oxide in oral diseases. *Archives of Oral Biology* **48**, 93-100.
9. Candeiro GTDM, Moura-Netto CD, D'Almeida-Couto RS *et al.* (2016) Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *International Endodontic Journal* **49**, 58-64.
10. Chen I, Salhab I, Setzer FC, Kim S, Nah HD (2016) A new calcium silicate-based bioceramic material promotes human osteo-and odontogenic stem cell proliferation and survival via the extracellular signal-regulated kinase signalling pathway. *Journal of Endodontics* **42**, 480-6.
11. Da Silva EJNL, Zaia AA, Peters OA (2017) Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clinical Oral investigations* **5**, 1531-6.
12. De Oliveira Mendes ST, Sobrinho APR, de Carvalho AT, de Souza Côrtes MI, Vieira LQ (2003) In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *Journal of Endodontics* **29**, 95-9.
13. De Oliveira Mendes ST, de Brito LCN, Rezende TMB *et al.* (2010) 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 Endodontology* **109**, 315- 323.
14. Elyassi Y, Moinzadeh AT, Kleverlaan CJ (2019) Characterization of Leachates from 6 Root Canal Sealers. *Journal of Endodontics* **45**, 623-7.
15. Fujiwara N, Kobayashi K. (2005) Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy* **4**, 281-6.
16. Han L, Okiji T (2013) Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *International Endodontic Journal* **46**, 808-14.
17. Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE (2012) Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. *Frontiers in immunology* **3**, 118.
18. Huang Y, Wu C, Zhang X, Chang J, Dai K (2018) Regulation of immune response by bioactive ions released from silicate bioceramics for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* **66**, 81-92.
19. Koch KA, Brave DG (2012) Bioceramics, part I: the clinician's viewpoint. *Dentistry Today* **31**, 130-5.
20. Lee A, Whyte MKB, Haslett C (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology* **54**, 283-8.
21. Liu S, Wang S, Dong Y (2015) Evaluation of a bioceramic as a pulp capping agent in vitro and in vivo. *Journal of Endodontics* **41**, 652-7
22. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW *et al.* (2011) Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *Journal of Endodontics* **37**, 673-7.

23. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology* **164**, 6166-73
24. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM (2007) Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics* **33**, 377-90.
25. MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K. *et al.* (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41,14-20.
26. Rezende TMB, Vargas DL, Cardoso FP, Sobrinho APR, Vieira LQ (2005) Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *International Endodontic Journal* **38**, 896-903.
27. Rezende TMB, Vieira LQ, Cardoso FP, *et al.* (2007) 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* **40**, 603-11.
28. Santos JM, Pereira S, Sequeira DB *et al.* (2019) Biocompatibility of a bioceramic silicone-based sealer in subcutaneous tissue. *Journal of Oral Science* **61**, 171-7.
29. Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K *et al.* (2009) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 189-99.
30. Souza GL, ROSatto CMP, Silva MJB, Silva MV, Rocha Rodrigues DB, Moura CCG (2019) Evaluation of apoptosis/necROSis and cytokine release provoked by three root canal sealers in human polymorphonuclears and monocytes. *International Endodontic Journal* **52**, 629-38.
31. Stashenko P, Teles R, d'Souza R (1998) Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **9**, 498-521.
32. Torabinejad M, Chivian N (1999) Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* **25**,197-205.
33. Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S (2013) Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology* **32**, 249-70.
34. Zamparini F, Siboni F, Prati C, Taddei P, Gandolfi MG (2019) Properties of calcium silicate-monobasic calcium phosphate materials for endodontics containing tantalum pentoxide and zirconium oxide. *Clinical Oral Investigations* **23**, 445-57.

5 CONCLUSÃO

Com este trabalho pode-se observar que:

- A viabilidade celular dos biocerâmicos e do MTA foi semelhante para os dois subtipos de macrófagos, em ambos ensaios testados.
- Os cimentos biocerâmicos e MTA não interferiram negativamente na capacidade de aderência e fagocitose de macrófagos M1 e M2;
- Macrófagos M1 produziram maior quantidade de ROS na presença do estímulo Zimosan.
- O cimento biocerâmico MK foi o que levou à maior produção de ROS por M1 na presença do estímulo.
- Os cimentos biocerâmicos foram semelhante ao MTA na capacidade de não interferir negativamente na produção de NO por macrófagos M1 e M2.
- A produção de TNF foi alta para M1 e o cimento Endosequence Bc Sealer foi o que mais aumentou.
- Os cimentos biocerâmicos e o MTA não interferiram na produção de TGF- β por ambos os subtipos de macrófagos

Do exposto, vê-se que, confirmou-se a hipótese nula, uma vez que os cimentos biocerâmicos apresentaram similaridade ao MTA, não interferindo nas funções efetoras dos macrófagos nos ensaios testados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., e PILLAI, S. (2015). *Imunologia celular e molecular*. Elsevier Brasil.

AL-HADDAD, A.; AB AZIZ, C.; ZETI, A. Bioceramic-based root canal sealers: a review. **International journal of biomaterials**, v. 2016, 2016.

ALMEIDA, L.H.S *et al.* Are premixed calcium silicate–based endodontic sealers comparable to conventional materials? a systematic review of in vitro studies. **J Endod**, v. 43, n. 4, p. 527-535, 2017.

ALMEIDA, L. H. *et al.* Bone tissue response to an MTA-based endodontic sealer, and the effect of the addition of calcium aluminate and silver particles. **Int Endod J**, 2019.

BALGUERIE E, *et al.* Sealer penetration and adaptation in the dentinal tubules: a scanning electron micROScopic study. **J Endod**, v. 37, n. 11, p. 1576-1579, 2011.

BARABA, A. *et al.* Cytotoxicity of two bioactive root canal sealers. **Acta stomatologica Croatica**, v. 50, n. 1, p. 1- 8, 2016.

BASTOS, K. R. B. *et al.* Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **J Leukocyte Biol**, v. 71, p. 271-278, 2002.

BRACKETT, M.G. *et al.* Inflammatory Suppression by Endodontic Sealers After Aging 12 Weeks In Vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials**, v. 91, p. 839-844, 2009.

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. **Int Endod J**, v. 47, p. 909-919, 2014.

BRAGA, J. M. *et al.* Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. **Dental Traumatology**, v. 31, p. 390-395, 2015.

BERNÁTH, M & J. SZABÓ, J. Tissue reaction initiated by different sealers. **Int Endod J**, v. 36, p. 256-261, 2003.

BIN, C.V. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 38, p. 495-500, 2012.

BOGEN, G. e KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **J Endod**, v. 35, n. 6, p. 777-790, 2009.

BORISH, L. C.; STEINKE, H. W. Cytokines and chemokines. **Journal Allergy Clin Immunology**, v. 111, n. 2, p. 460-475, 2003.

BORGES, R.P. *et al.* Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. **Int Endod J**, v. 45, p. 419-428, 2012.

BOZEMAN, T. B.; LEMON, R.R. e ELEAZER, P. D. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. **J Endod**, v. 32, n. 5, p. 425-428, 2006.

CAMILLERI, J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. **Endod. Top.**, v. 32, n. 1, p. 31-46. 2015.

CANDEIRO, G. T. M. *et al.* Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions and flow of a bioceramic root canal sealer. **J Endod**, v. 38, p. 842-847, 2012.

CANDEIRO, G. T.M. *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. **Int Endod J**, v. 49, p. 858-864, 2016.

CASTELLUCCI, A. & WEST, J. D. **Endodontics**, vol II. Il Tridente Srl, Firenze, p. 548-563, 2005.

CHEN, I. *et al.* A new calcium silicate–based bioceramic material promotes human osteo- and odontogenic stem cell proliferation and survival via the extracellular signal-regulated kinasesignaling pathway. **J Endod**, v. 42, p. 480-486, 2016.

DAMAS, B. A *et al.* Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. **J Endod**, v. 37, n. 3, p. 372-375, 2011.

DE BRITO, L.C. *et al.* T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. **J Endod**, v. 38, p. 481-485, 2012.

DE DEUS, G. *et al.* O impacto da introdução do MTA em Endodontia. In: FREGNANI, E., HIZATUGU, R. Endodontia: uma visão contemporânea. Santos: Livraria Santos editora. 2012, cap. 36, p.455-487.

DE OLIVEIRA MENDES, S.T. *et al.* In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **J Endod**, v. 29, p. 95-99, 2003.

DE WAAL, M. R. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1209, 1991.

EDWARDS, J.P. *et al.* Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, v. 80, p. 1298-1307, 2006.

FIORENTINO, D. F. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**, v. 147, p. 3815, 1991.

FORD, T. R. *et al.* Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 79, n. 6, p. 756-763, 1995.

FUJIWARA, N. e KOBAYASHI, K. Macrophages in Inflammation **Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 281-286, 2005.

GREEN, L.C. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids **Analytical biochemistry**, v. 126, n.131-138, 1982.

GIAIMIS J, *et al.* A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **J Immunol Method**, v.154, p.185-193, 1992.

GROSSMAN, L. Physical properties of root canal cements. **J Endod**, v. 2, p. 166-175, 1976.

HASTURK H.; KANTARCI A. e VAN DYKE, T.E. Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. **Frontiers in Immunology**, v.3, p.118, 2012.

HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

HUANG, Y. *et al.* Evaluation of the sealing ability of different root canal sealers: a combined SEM and micro-CT study. **J Appl Oral Sci.** v. 26, supl 20160584, 2018.

JITARU, S. *et al.* The use of bioceramics in endodontics - literature review. **Clujul Medical**, v. 89, n. 4, p. 470-473, 2016.

JUNG, G.Y.; PARK, Y.J. e HAN, J.S. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, p. 1649-1654, 2010.

KHALIL, W.A.; ABUNASEF, S.K. Can mineral trioxide aggregate and nanoparticulate endosequence root repair material produce injurious effects to rat subcutaneous tissues?. **J Endod**, v. 47, n. 7, p. 1151-1156, 2015.

KOCH, K.A. e BRAVE, D.G. Bioceramics, part 1: the clinician's viewpoint. **Dent Today** v. 31, n. 1, p. 130-135, 2012.

LEE, A.; WHYTE, M. K. B. e HASLETT, C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. **J Leukocyte biology**, v. 24. p. 283-288,1993.

LEE, S.J.; MONSEF, M. e TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **J Endod**, v. 19, p. 541-544, 1993.

LEE, Y. L. *et al.* Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 787-793, 2004.

LIU, S,; WANG, S.; DONG, Y. Evaluation of a Bioceramics as a Pulp Capping agent in vitro and in vivo. **J Endod**, v.41, n.5, p.1-6, 2015.

LOPES, H.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F. Endodontia biologia e técnica. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

LOUSHINE, B.A. *et al.* Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. **J Endod**, v.37, p. 673-677, 2011.

MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, p. 677-686, 2004.

MARTON, I.J. e KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 139-150, 2000.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Dental Traumatology**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2000.

MILLS, C.D. *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**, v. 164, n.12, p. 6166-6173, 2000.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **J Leukocyte Biology**, v. 73, p. 209-212, 2003.

MOSSER, D. M. e EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958, 2008.

MURRAY, P.E., GARCIA-GODOY, F. e HARGREAVES, K.M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. **J Endod**, v. 33, p. 377-90, 2007.

NG, Y.L. *et al.* Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature—Part 2. Influence of clinical factors. **Int Endod J**, v. 41, n. 1, p. 6-31, 2008.

PARIROKH, M. e TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J Endod**, v. 36, p. 16-27, 2010.

PENG W, *et al.* Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. **J Endod**, v.37, p. 1240-1246, 2011.

PRIYANKA, S. e VERONICA, A. A literature review of root-end filling materials. **IOSR J. Dent. Med. Sci.** v. 9, n. 4, p. 20-25, 2013.

OLIVEIRA, N. G. *et al.* Comparison of the biocompatibility of calcium silicate-based materials to mineral trioxide aggregate: Systematic review. **European Journal of Dentistry**, v. 12, n. 2, p. 317-326, 2018.

- REZENDE, T.M. *et al.* Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. **Int J Endod**, v. 38, p. 899-903, 2005.
- REZENDE, T.M. *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. **Int Endod J**, v. 40, p. 603-11. 2007.
- SCARPARO, R.K.; HADDAD, D. e ACASIGUA, G.A.X. Mineral trioxide aggregate–based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. **J Endod**, v. 36, p.1174-1178, 2010.
- SJOGREN, U. *et al.* Gutta-perchastimulated mouse macrophages release factors that activate the bone resorptive system of mouse calvarial bone. **European Journal of Oral Sciences** 106, 872-881, 1998
- SOUZA, G. L. *et al.* Evaluation of apoptosis/necrosis and cytokine release provoked by three root canal sealers in human polymorphonuclears and monocytes. **Int Endod J**, v. 52, n. 5, p. 629-638, 2019.
- STASHENKO, P.; TELES, R. e D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 9, p. 498-521, 1998.
- STERN, M. H. *et al.* Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granulomas. **J Endod**, v. 7, n. 3, p. 117-122. 1981.
- SOUZA, L.R., CAVALCANTI, B.N. e MARQUES, M.M. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. **Photomedicine and laser surgery**, v. 27, p. 37-42, 2009.
- TAVARES, C. O. *et al.* Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate–containing endodontic sealer. **J Endod**, v. 39, p. 653–657, 2013.
- TORABINEJAD, M. e CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 25, p. 197–205, 1999.
- VAN DYKE, T.E. The management of inflammation in periodontal disease. **J periodontol**, v. 79, p. 1601-1608, 2008.

ZAMPARINI, F. *et al.* Properties of calcium silicate-monobasic calcium phosphate materials for endodontics containing tantalum pentoxide and zirconium oxide. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, p. 445-447, 2019.

ZHANG, W.; LI, Z. e PENG, B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 6, p. e79-e82, 2009.

ZHAO, W. *et al.* In vitro bioactivity of novel tricalcium silicate ceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 917-923, 2007.

ZHOU, H. *et al.* In Vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. **J Endod**, v. 41, p. 56-61, 2015.

ANEXO A- Aprovação do Comitê de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito dos cimentos biocerâmicos nas respostas de macrófagos M1 e M2 em murinos.", protocolo do CEUA: 15/2018 sob a responsabilidade de Wanley Luciano Fonseca Tavares que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/05/2018.

Vigência da Autorização	07/05/2018 a 06/05/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	5
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	5
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	5
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	5
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	5
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas

	Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo Isogênico / Balb/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo Isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo Isogênico / Balb/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo Isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo Isogênico / Balb/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	Indiferente
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais

Considerações posteriores:

07/05/2018	Aprovado com recomendação na reunião do dia 07/05/2018. Validade: 07/05/2018 a 06/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.
------------	---

Belo Horizonte, 07/05/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/