

FRANCIELEN OLIVEIRA FONSECA

**ANÁLISE IMUNOLÓGICA DOS EFEITOS DOS CIMENTOS
MTA, BIO-C REPAIR E BIO-C REPAIR ÍON⁺ NAS RESPOSTAS
DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE MURINO**

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

FRANCIELEN OLIVEIRA FONSECA

**ANÁLISE IMUNOLÓGICA DOS EFEITOS DOS CIMENTOS
MTA, BIO-C REPAIR E BIO-C REPAIR ÍON⁺ NAS RESPOSTAS
DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE MURINO**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Coorientador: Prof. Dr. Warley Luciano Fonseca Tavares.

**Belo Horizonte
2022**

Ficha Catalográfica

F676a Fonseca, Francielen Oliveira.
2022 Análise imunológica dos efeitos dos cimentos MTA, Bio-C
T Repair e Bio-C Repair Íon+ nas respostas de macrófagos
inflamatórios de murino / Francielen Oliveira Fonseca. --
2022.

52 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. Macrófagos. 3. Teste de materiais. 4.
Cimentos dentários. 5. Materiais biocompatíveis. I. Ribeiro
Sobrinho., Antônio Paulino. II. Tavares, Warley Luciano
Fonseca. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE IMUNOLÓGICA DOS EFEITOS DOS CIMENTOS MTA, BIOC REPAIR E BIO-C REPAIR ÍON+ NAS RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE MURINO

FRANCIELEN OLIVEIRA FONSECA

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

Aprovada em 20 de outubro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

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

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

Prof(a). Daniela Augusta Barbato Ferreira
Faculdade Arnaldo - BH

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

Belo Horizonte, 20 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Warley Luciano Fonseca Tavares, Coordenador(a)**, em 24/10/2022, às 20:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2022, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Augusta Barbato Ferreira, Colaborador(a) terceirizado(a)**, em 25/10/2022, às 13:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Reis Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 27/10/2022, às 22:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1778667** e o código CRC **254EBEBA**.

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial ao grande amor da minha vida, minha querida mãe, a qual durante esta trajetória partiu desta dimensão, mas permanece, mais do que nunca, viva em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Início estes agradecimentos ao meu Deus maior, entidade superior que me rege, abençoa, protege e ilumina, junto à proteção de meus anjos da guarda. Deus este que tem planos muito maiores que os meus e que me mostra que preciso confiá-los, mesmo que muitas vezes eu os questione.

Durante esta caminhada infelizmente tive a pior perda que eu poderia ter na vida; minha mãe partiu desta dimensão. A ela devo toda a honra da conclusão deste trabalho, pois foi quem mais torceu, se orgulhou e rezou para me ver conseguindo, cada vez mais, alçar voos grandes através do estudo. Mãe, eu te amo infinitamente! Te sinto comigo, obrigada por tudo que fez por mim, obrigada por me fazer ser quem hoje eu sou, obrigada por me dar forças para seguir, ser alguém cada vez melhor e por me abençoar. Obrigada por agora ser meu anjo da guarda. Você é o amor da minha vida!

Agradeço também ao meu pai, pessoa justa e que nunca mediu esforços para propiciar conforto e educação aos seus filhos. Essa conquista não seria possível sem você. Ao Igor, meu irmão, o meu muito obrigada por todo o amor e cuidado que tem comigo. A todos os demais amigos, meu companheiro, familiares, minha madrinha, pessoas as quais fazem parte do meu caminho e fizeram parte do processo deste trabalho e do processo vida, obrigada!

Em especial agradeço aos meus orientadores, os quais tenho profunda admiração: Prof. Antônio Paulino e Prof. Warley. Vocês foram incríveis desde até mesmo antes do início. Vocês fizeram o processo de todo este trabalho, o qual trabalhamos com seriedade, ainda assim ser leve, com boas conversas e amizade. Fui muito feliz em aprender com vocês dentro e fora da clínica. Obrigada pela competência, paciência, ajudas, ensinamentos, incentivos e carinho. Ao Warley, obrigada por ter confiado, ensinado, compartilhado e me incentivado a dar início a tudo isso.

A todos os demais queridos professores de Endodontia, responsáveis pela minha formação, que muitos se tornaram amigos; Prof. Luiz Carlos – meu querido amigo e mestre número 01. Ciça, Bebel, Gustavo, Luiza, Francine... O meu muito obrigada por exercerem com maestria essa profissão tão nobre e

linda que é ser professor e assim tão me ensinarem, incentivarem e fazer brilharem meus olhos.

Também agradeço aos colegas do laboratório de imunologia do ICB. Profa. Leda Quércia pelo espaço para a realização desse trabalho e aos amigos e colegas que fizeram parte: Betânia, Marcela e Layara. Tudo foi mais leve por podermos ter compartilhado momentos dessa caminhada, dividido e multiplicado conhecimentos.

Por fim, agradeço as agências de fomento, a Faculdade de Odontologia da UFMG, a todos os professores e ao nosso Colegiado de Pós-graduação.

“ O fim de um ciclo é a luz de um novo começo. ”

Muito obrigada!

HOMENAGEM

Aos que partiram em virtude da pandemia;

Hoje, de algum lugar longe dessas terras
Há um doce olhar só para você
Um olhar especial
De alguém especial, de distantes origens
Um olhar de um justo coração que pulsa só a vida
Que sorri porque ama plenamente
Sem julgamentos, preconceitos nem prisões
Hoje, como ontem, longe desses céus
Há um encantador olhar só para você
Nesse olhar vai para você a magia da luz
A simplicidade do perdão
A força para comungar com a vida
A esperança de dias mais radiantes de paz
Hoje, de algum lugar dentro de você,
Alguém que já o amou muito e ainda o ama
Diz para você que valeu a pena ter estado nessas terras...
Sob estes céus...
Falando de união, paz, amor e perdão
Pode sentir a força que faz você sorrir
E continuar o caminho
Que um dia aquele doce olhar iniciou para você
Tudo isso, só para você saber,
que a vida continua...
e a morte é uma viagem.

A vida continua...

Paulo Kronemberger

“ O caminho confortável pode ser fácil, mas não o melhor, a conquista só tem valor se existir sacrifício, vence quem luta, batalha quem quer ser vencedor, busque seus triunfos na linha do desconforto, lá, a preguiça dói. Teria honras um troféu sem campeonato, seria amada uma aliança sem amor, poderia o final do livro ser sensacional sem uma história? Em nossas vidas a certeza é a morte. Terá sentido lembranças e carinho se vivermos na sombra, na inveja e na maldade? ”

Autor Desconhecido

RESUMO

As melhorias alcançadas nas propriedades físico-químicas dos materiais endodônticos permitiram a utilização de materiais de reparo em situações clínicas que eram consideradas críticas. Os chamados biocerâmicos, derivados do MTA, apresentando boa biocompatibilidade e bioatividade, se tornaram uma solução eficaz. Estes materiais apresentam propriedades clínicas melhoradas, com excelente consistência e manuseabilidade, além de adequado tempo de trabalho e presa. Estes cimentos seguem em evolução e as empresas vêm investindo em melhorias em suas composições com o intuito de potencializar suas propriedades biotivas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o cimento biocerâmico Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) e o seu potencial sucessor, o cimento Bio-C Repair Íon⁺ (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), bem como o MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil). Foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA-UFMG 350/2019). Tais biocerâmicos foram avaliados quanto às respostas de macrófagos. Os experimentos foram realizados no laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Utilizou-se macrófagos murinos obtidos de camundongos C57BL/6 quando se avaliou a viabilidade celular (pelo método MTT), a aderência celular, a capacidade de fagocitose (na presença da levedura *S. boulardii*) e a detecção da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), na ausência e na presença de Zymosan A (de *Saccharomyces cerevisiae*), bem como, na presença e na ausência dos cimentos. Os macrófagos inflamatórios foram obtidos do peritônio dos animais após a injeção de caldo Tioglicolato estéril a 3%. Após aspirados, os macrófagos foram centrifugados e a concentração celular final foi ajustada de acordo com cada ensaio proposto: viabilidade e aderência (1×10^6 cel/mL); ensaio de fagocitose e ROS (5×10^5 cel/mL). Fez-se a manipulação dos materiais sob fluxo laminar, quando foram inseridos em capilares estéreis. Os resultados de viabilidade celular demonstraram que houve diferença significativa na cultura de 24 horas, tratada com o Bio-C Repair Íon⁺, em relação ao grupo controle. Os ensaios de fagocitose e aderência celular não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. As análises demonstraram expressivos níveis de ROS quando as células foram tratadas na presença de Zymozan A. Na presença desse estímulo, o Bio-C Repair Íon⁺ apresentou diferença significativa em relação a todos os demais biocerâmicos e ao grupo controle. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA ($P < 0,05$), comparando-se os grupos experimentais entre si e o grupo controle. Conclui-se que o novo material reparador Bio-C Repair Íon⁺ apresenta ações de biocompatibilidade quase semelhantes ao Bio-C Repair e MTA. As diferenças observadas em relação ao Bio-C Repair Ion⁺ quanto à viabilidade celular e a produção de ROS podem estar relacionadas ao íon metálico presente em sua composição.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, Macrófagos, Endodontia, MTA, Bio-C Repair Ion⁺.

ABSTRACT

EFFECTS OF CEMENTS MTA, BIO-C REPAIR AND BIO-C REPAIR ION+ ON INFLAMMATORY MURINE MACROPHAGE RESPONSES, AN IMMUNOLOGICAL ANALYSIS

The improvements achieved in the physicochemical properties of endodontic materials allowed the use of repair materials in clinical situations considered critical. The so-called bioceramics, derived from MTA, showing good biocompatibility and bioactivity, have become an effective solution. These materials have improved clinical properties, exhibiting excellent consistency and handling, as well as good working and setting time. These types of cement are still evolving, and companies have been investing in improvements in their compositions to enhance their bioactive properties. This study aimed to evaluate the Bio-C Repair bioceramic cement (Angelus, Londrina, Paraná, Brazil) and its potential successor, the Bio-C Repair Ion+ (Angelus, Londrina, Paraná, Brazil), as well as the MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brazil). The Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) approved the study (350/2019). Such bioceramics were evaluated in macrophage responses. The experiments were carried out in the Gnotobiology and Immunology laboratory of the Institute of Biological Sciences (ICB) of the UFMG. Murine macrophages obtained from C57BL/6 mice were used to evaluate cell viability (by the MTT method), cell adhesion, phagocytosis capacity (in the presence of the yeast *S. boulardii*), and in the detection of the production of Reactive Oxygen Species (ROS) in the absence and presence of Zymosan A (from *Saccharomyces cerevisiae*), as well as in the presence and absence of types of cement. Inflammatory macrophages were obtained by injecting sterile 3% thioglycolate broth into the animals' peritoneum. After aspirating, the macrophages were centrifuged, and the final cell concentration was adjusted according to each proposed assay: viability and adherence (1×10^6 cells/mL), phagocytosis, and ROS assay (5×10^5 cells/mL). The materials were manipulated under laminar flow when inserted into sterile capillaries. The cell viability results showed a significant difference in the 24-hour culture, treated with Bio-C Repair Ion+, to the control group. The phagocytosis and cell adhesion assays showed no statistically significant difference between the groups. The analyses showed expressive ROS levels when the cells were treated in the presence of Zymosan A. In the presence of this stimulus, the Bio-C Repair Ion+ showed a significant difference between all other bioceramics and the control group. The results were analyzed by the ANOVA test ($P < 0.05$), comparing the experimental groups and the control group. It is concluded that the new repair material Bio-C Repair Ion+ has biocompatibility actions almost similar to Bio-C Repair and MTA. The differences observed with Bio-C Repair Ion+ regarding cell viability and ROS production may be related to the metallic ion's composition.

Keywords: Biocompatibility, Macrophages, Endodontics, MTA, Bio-C Repair Ion+.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Gráfico do ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT. Porcentagem de macrófagos vivos após incubação em placas de cultura de 96 poços com capilares contendo os materiais. Os controles foram cultivados com capilares vazios. As culturas foram mantidas por 24, 48 e 72 horas, conforme descrito em materiais e métodos. As barras representam a média de dois experimentos feitos em triplicata; as linhas representam o erro padrão das médias. * indica diferença estatística para a viabilidade celular em comparação com o grupo controle ($P < 0,05$), pelo teste ANOVA.....32

Figura 2 – Gráfico do ensaio de aderência celular. Porcentagem de macrófagos aderentes após incubação em placas de cultura com capilares contendo os materiais. Os controles foram cultivados com capilares vazios. As culturas foram realizadas conforme descrito nos materiais e métodos. As barras representam a média dos resultados de três experimentos feitos em duplicata. As linhas indicam o erro padrão das médias. Não foi observada diferença estatísticas entre os grupos ($P < 0,05$).....33

Figura 3 – Gráfico da porcentagem de macrófagos com leveduras fagocitadas (A) e número médio de leveduras fagocitadas por cada macrófago (B). Os controles foram cultivados com capilares vazios. As culturas foram realizadas conforme descrito nos materiais e métodos. As barras representam os resultados médios de três experimentos feitos em duplicata. As linhas indicam o erro padrão das médias. Não foi observada diferença estatísticas entre os grupos ($P < 0,05$).....34

Figura 4 - Gráfico da média expressa sob a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas culturas de macrófagos. As células foram cultivadas com capilares contendo os materiais e estimuladas com Zimosan A, conforme descrito nos materiais e métodos. As barras representam os resultados médios de dois experimentos feitos em triplicata. As linhas indicam o erro padrão das médias. M indica cultura de macrófagos contendo os materiais ou não (controle). M + Z indica culturas de macrófagos estimuladas com Zymosan A na presença de materiais ou na sua ausência (controle). O símbolo (*) indica diferença estatística significativa para a produção de ROS em meio estimulado entre os grupos ($P < 0,05$), pelo teste ANOVA.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2CaOSiO ₂	Silicato dicálcico
3CaOAl ₂	Aluminato tricálcico
3CaOSiO ₂	Silicato tricálcico
ANOVA	Análise de variância
BCR	Bio-C Repair
BCRI+	Bio-C Repair Íon ⁺
C57BL/6	Tipo de linhagem de camundongo de laboratório
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaAl ₂ O ₄	Aluminato de cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CaSiO ₃	Silicato de cálcio
CaSO ₄	Sulfato de cálcio
CaWO ₄	Tungstato de cálcio
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comitê de ética e pesquisa em animais
CFU	Colony Forming Unit
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsufóxido
EUA	Estados Unidos da América
Fe ₂ O ₃	Óxido de ferro
H ₂ O	Água
ICB	Instituto de ciências biológicas
MgO ₃ Si	Silicato de magnésio
mL	Mililitro
MTA	Mineral Trioxide Aggregate
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NO	Óxido nítrico
OH ⁻	Íon hidroxila
PBS	Tampão fosfato-salino
pg	Picograma

pH	Potencial hidrogeniônico
ROs	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCR	Sistema de canais radiculares
SiO ₂	Dióxido de silício
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ZrO ₂	Óxido de zircônio
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	METODOLOGIA EXPANDIDA	21
3.1	Animais.....	21
3.2	Microrganismos.....	22
3.3	Cimentos reparadores.....	22
3.4	Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais inflamatórios.....	23
3.5	Viabilidade Celular.....	23
3.6	Aderência Celular.....	24
3.7	Ensaio de fagocitose da levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	25
3.7.1	Coloração com Panótico Rápido.....	26
3.8	Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	26
3.9	Análises estatísticas dos dados.....	27
4	ARTIGO	28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERENCIAS	49

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A endodontia é a especialidade responsável por prevenir, diagnosticar e tratar as doenças que acometem os tecidos pulpaes e suas repercussões perirradiculares, visando a manutenção do dente na cavidade bucal e a saúde dos tecidos periapicais. Quando é necessária a intervenção endodôntica, o tratamento consiste em utilizar manobras técnicas mecânico-químicas que visam remover a polpa vital ou necrótica, modelar, limpar e, por fim, selar tridimensionalmente o sistema de canais radiculares (HARGREAVES K. M.; COHEN S., 2011; LOPES & SIQUEIRA, 2020).

Apesar dos altos índices de sucesso relatados, que variam em uma média de 80%, em muitos casos nos deparamos com complicações que envolvem perfurações, desvios, e até mesmo situações não iatrogênicas, mas que envolvem maior grau de dificuldade para a resolução clínica, como em casos de reabsorções e dentes com rizogênese incompleta (TORABINEJAD, 2018). Em tais situações, torna-se necessário o uso de um material reparador para promover um adequado selamento e vedamento da condição clínica que se quer tratar.

Em 1993, o professor Mahmoud Torabinejad (Universidade de Loma Linda, EUA) buscava desenvolver um material para se tratar as perfurações radiculares, logo, necessitava que esse material tomasse presa quando em contato com os fluidos. Surgiu então um cimento reparador que ficou conhecido como Agregado Trióxido Mineral (MTA), material à base de Silicato de Cálcio (LEE *et al.*, 1993). Para se obter Silicato de Cálcio é necessária uma mistura de três óxidos: Silício, Alumínio e Cálcio, no entanto a fórmula de um Silicato de Cálcio não é única e pode abranger variedades de composições (ZAFAR *et al.*, 2020).

Somente em 1998, após muitas pesquisas, esse material foi disponibilizado para uso clínico. Em 1999, a Dentsply lançou ProRoot MTA, o mesmo material à base de Silicato de Cálcio associado a um radiopacificador, o óxido de bismuto. A adição de um radiopacificador teve o intuito de permitir radiograficamente a identificação do MTA no local onde se encontra inserido. Retirou-se também da composição do MTA os íons pesados por meio de um

processo de refinamento e maior controle de manufaturamento (DUARTE *et al.*, 2005).

Após a utilização inicial do MTA como material reparador de perfurações, o mesmo passou a ser amplamente utilizado em outras situações clínicas, tais como nas reabsorções radiculares, capeamento pulpar, pulpotomias, indução da formação de barreira apical em dentes com ápices abertos, retro-obturações, dentre outras (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010).

A grande indicação e aplicabilidade desse material se deveu principalmente à suas características de biocompatibilidade e bioatividade. A biocompatibilidade é a capacidade de promover uma resposta adequada ao tecido ao qual o material é aplicado, sem apresentar efeitos deletérios, além de promover um efeito benéfico. A bioatividade se refere à promoção de uma ligação mineral específica e intencionalmente desejada ao substrato onde o material se encontra inserido (VALLITTU *et al.*, 2018). Assim, o material interage com o tecido receptor trazendo benefícios e levando ao sucesso clínico (REYES-CARMONA *et al.*, 2009). Na interface do biomaterial e do tecido ocorre uma interação que culminará com uma camada de apatita carbonatada, que compõe a fase mineral dos tecidos duros (osso, dentina e cimento) (HENCH L.L., 1991; TAY *et al.*, 2007). Apresentando expansão e boa vedação, bem como estabilidade dimensional e capacidade de tomar presa na presença de umidade, o MTA tornou-se popular entre clínicos e especialistas em endodontia (CAMILLERI *et al.*, 2015; VALLÉS *et al.*, 2013).

No Brasil, a empresa Angelus (Londrina, Paraná, Brasil) foi a primeira a desenvolver o MTA nacional, a partir do ano de 2001. Desde então a empresa vem aprimorando sua formulação na busca por reverter desvantagens clínicas que ele ainda possuía. Entre as particularidades do MTA que ainda causavam entrave em sua utilização, estão: a dificuldade de manipulação e inserção, reduzido tempo de trabalho e falta de um bom escoamento (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010).

Assim, o MTA continuou a ser estudado e novas matérias à base de silicato de cálcio foram disponibilizados, passando a ser chamados de cimentos biocerâmicos. Esses cimentos aprimoraram as propriedades físico-químicas do MTA, assegurando as importantes propriedades biológicas que apresentam (CAMILLERI *et al.*, 2015; DARVELL & WU, 2011; VALLÉS *et al.*, 2013).

No ano de 2019, a empresa Angelus lançou o Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), um biocerâmico reparador, com apresentação pronta para uso. Como os demais, necessita da umidade local para iniciar seu processo de hidratação, liberação de íons e biomineralização. Apesar de seu curto tempo de lançamento, um estudo já demonstrou que o Bio-C Repair apresenta citocompatibilidade e induz a biomineralização semelhantemente ao MTA (BENETTI *et al.*, 2019).

A empresa Angelus, pensando em aprimorar ainda mais a formulação desse material e potencializar suas características de bioatividade, desenvolveu seu potencial sucessor, o Bio-C Repair Íon⁺ (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil). O Bio-C Repair Íon⁺ modificou o silicato de cálcio em sua composição. A fórmula modificada de silicato de cálcio substituiu o óxido de alumínio em sua composição pelo óxido de magnésio. Ao final da fabricação desse silicato de cálcio modificado é obtido então Silicato de Cálcio e Magnésio (Ca₂MgSi₂O₇) (Angelus Indústria Produtos Odontológicos, 2019, p.02).

Devido à sua formulação química, essa formulação de Silicato de Cálcio modificado possui características singulares em termos de bioatividade. Sua estrutura molecular (formado por um duplo tetraedro de sílica conectados por um átomo de oxigênio compartilhado – [Si₂O₇]⁶⁻ – através de uma ligação covalente – Si-O – sendo ligados por dois íon metálicos – Ca²⁺ e Mg²⁺) fornece baixa solubilidade, que ao liberar vários íons metálicos de maneira constante e equilibrada, é capaz de promover diferenciação osteogênica de osteoblastos, das células da polpa dentária, fibroblastos e células do ligamento periodontal, além de também ser capaz de acelerar a regeneração óssea (HOPPE *et al.*, 2011). Sua composição objetiva então intensificar a liberação de íons no meio a fim de promover a potencialização de uma maior e mais rápida biomineralização.

Os cimentos biocerâmicos são colocados em contato direto com células dos tecidos pulpares e perirradiculares. Esses tecidos exibem grande quantidade de células imunocompetentes, dentre as quais os macrófagos são as mais predominantes. Estas células estão entre as primeiras a entrarem em contato com os corpos estranhos, desempenhando papel principal na patogênese do processo inflamatório. Torna-se, portanto, desejável que o biomaterial não interfira na resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (BRAGA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003; REZENDE *et al.*, 2005; YUNNA *et al.*, 2020).

Os macrófagos são células que atuam na modulação da resposta imuno-inflamatória, apresentando papéis relevantes tanto na imunidade inata (como, por exemplo, com o seu mecanismo de fagocitose), quanto na imunidade adaptativa (como, por exemplo, sendo células apresentadoras de antígeno). Inicialmente, essas células aderem-se a um substrato para em seguida iniciar o processo fagocítico. Os macrófagos após ativados reagem contra os patógenos produzindo óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (MOSSER D.M., 2003). Ademais, essas células irão liberar citocinas que promoverão a iniciação, perpetuação e o direcionamento da resposta imune (METZGER Z., 2000).

Diante do exposto e tendo em vista a relevante atuação dos macrófagos nas respostas imuno-inflamatória e nos processos de cicatrização tecidual, este estudo analisará tais respostas quando essas células entram em contato com os cimentos MTA, o Bio-C Repair; e com o seu potencial sucessor, o Bio-C Repair Íon⁺.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar as respostas celulares de macrófagos inflamatórios murinos, obtidos de camundongos C57BL/6, na presença dos biomateriais, MTA, Bio-C Repair e Bio-C Repair Íon⁺ (Angelus - Londrina, Paraná, Brasil).

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade celular de macrófagos cultivados na presença e ausência (controle) dos biocerâmicos;
- Avaliar a capacidade de aderência de macrófagos cultivados na presença e ausência (controle) dos biocerâmicos;
- Avaliar a capacidade de fagocitose dos macrófagos cultivados na presença e ausência (controle) dos biocerâmicos;
- Avaliar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROs) pelos macrófagos estimulados ou não por Zymozan A, cultivados na presença e ausência (controle) dos biocerâmicos.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. Avaliou-se a viabilidade celular, a capacidade de aderência, a atividade fagocítica e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos da linhagem de camundongos C57BL/6 quando em contato com os cimentos biocerâmicos. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais (CEUA-UFMG 350/2019).

Constituíram-se três grupos experimentais de acordo com o cimento biocerâmico testado e um grupo controle negativo (representado por capilares vazios), como se segue:

Grupo I – tubos capilares contendo o cimento MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil);

Grupo II – tubos capilares contendo o cimento Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil);

Grupo III – tubos capilares contendo o cimento Bio-C Repair Íon⁺ (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil);

Grupo IV – tubos capilares vazios (controle).

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
MTA	BIO-C REPAIR	BIO-C REPAIR ÍON⁺	CONTROLE

3.1 Animais

Utilizaram-se camundongos C57BL/6, fêmeas, de quatro a oito semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil. Os animais foram mantidos em biotério com barreiras, em gaiolas apropriadas de 20cmx30cmx20cm, contendo no máximo cinco animais em cada gaiola, de acordo com as normas de bioterismo vigentes, sob controle de temperatura, luminosidade, água e ração *ad libitum*.

3.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram: *Saccharomyces boulardii* (obtida através de cápsulas de Floratil, Merk S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), utilizado nos ensaios de fagocitose; e o Zymosam A, de *Saccharomyces 1cerevisae* (Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, EUA), utilizado no ensaio de produção de ROS. *S. boulardii* foi selecionada devido ao seu tamanho, o que facilitou a sua contagem extra e intracelularmente. A relação entre o número de microrganismos utilizados/células em cultura, em cada ensaio realizado, foi previamente padronizada em uma curva dose-resposta.

3.3 Cimentos reparadores

Utilizaram-se três cimentos reparadores endodônticos:

- MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), composto por silicato dicálcico; silicato tricálcico; aluminato tricálcio; ferroaluminato tetracálcico; óxido de bismuto.
- Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), cimento pronto para uso, composto por silicatos de cálcio; aluminato de cálcio; óxido de cálcio; óxido de zircônio; óxido de ferro; dióxido de silício; agente de dispersão.
- Bio-C Repair Íon⁺ (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), cimento pronto para uso, composto por silicatos de cálcio; silicatos de magnésio; óxido de cálcio; óxido de zircônio; dióxido de silício; agentes de fixação e agentes de união.

O MTA foi manipulado de acordo com as especificações do fabricante, em condições de esterilidade, sob fluxo laminar. Ainda sob fluxo laminar, todos os três cimentos foram inseridos nas extremidades de tubos capilares (Mícron, Trianon Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), previamente cortados e esterilizados. Essa manobra permitiu que o contato dos cimentos com a suspensão celular fosse padronizado, já que o diâmetro de todos os tubos correspondem a 3,52 mm². A seguir, os tubos contendo os cimentos foram armazenados em placa de cultura de seis poços (Nunclon™, Nalge Nunc International, Naperville, IL, EUA). O grupo controle foi representado pelos tubos capilares vazios (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

3.4 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais inflamatórios

Os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 2mL de tioglicolato estéril, à 3%, contendo 1% de ágar esterilizado (Biobras S.A.®, Montes Claros, MG, Brasil). Após 05 dias, os animais foram sacrificados por meio do deslocamento cervical. Com o intuito de se conseguir o maior conteúdo possível da suspensão celular, injetou-se intraperitonealmente, com auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha de 21 guarges, 10mL de um meio neutro, composto por uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X estéril. A seguir, aspirou-se o maior conteúdo possível da suspensão, com a mesma seringa e agulha, centrifugando o conteúdo aspirado à 350rpm, durante dez minutos, à 4°C. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspendidas em meio completo, composto por RPMI 1640, sem o fenol vermelho, suplementado com 10% de soro bovino fetal bovino (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), 0,1% de solução de β -mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.) a 0,05M, 0,2% de gentamicina, 200mM de L-glutamina. As células foram contadas em câmara de Neubauer, sob microscopia ótica, confirmando-se que mais de 90% delas apresentavam características morfológicas de macrófagos (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

A concentração final das células foi ajustada de acordo com cada ensaio proposto. Para os ensaios de viabilidade celular, 1×10^6 células foram cultivadas em placa de 24 poços; para os ensaios de fagocitose e produção de ROS, utilizaram-se 5×10^5 células/mL; e, por fim, para a verificação de aderência celular, foram utilizadas 1×10^6 células/mL. Todas as incubações foram realizadas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, à 37°C (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

3.5 Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular frente ao substrato foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Nunclon™, Nalge Nunc International), por meio do ensaio MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

O ensaio com o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) baseia-se na redução do sal de tetrazólio (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais succínicas em células viáveis, produzindo cristais roxos insolúveis de formazan, enquanto que as células mortas ou inviáveis não conseguem fazer esta conversão (Mosmann, 1983). Em cada poço da placa de 12 poços (NuncloTM) adicionou-se 200µL da suspensão celular, a uma concentração de 1×10^6 células/mL e os capilares contendo ou não os cimentos. As placas foram incubadas em estufa umidificada, à 37°C, por 24, 48 e 72 horas. Após cada período, os capilares foram removidos e os poços lavados três vezes com PBS 1X. Em seguida, acrescentou-se 100µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e, novamente, a placa foi incubada por mais três horas, nas mesmas condições. Após esse período, fez-se a remoção dos 100µL do sobrenadante de cada poço e, adicionou-se dimetilsufóxido PA (DMSO). A seguir, fez-se a leitura em leitor de microplaca (PowerWave HT, BioTek, EUA) (Braga *et al.* 2014). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade.

3.6 Aderência Celular

A aderência de macrófagos inflamatórios ao substrato foi realizada em tubos de polipropileno estéreis (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra). Foram adicionadas 1mL de suspensões celulares contendo 1×10^6 células/mL e os capilares contendo ou não os cimentos biocerâmicos. Após duas horas de incubação em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, a 37°C, os tubos foram levados ao vortex, por cinco segundos, em baixa velocidade, para promover a homogeneização. Em seguida, alíquotas de 20µL de cada amostra foram removidas, e acondicionadas em câmaras de Neubauer. Estas foram armazenadas no interior de placas de petri umidificadas e, novamente incubadas a 37°C, por 18 horas. A seguir, realizou-se a contagem dos macrófagos aderentes e dos não aderentes, sob microscopia óptica. A porcentagem de macrófagos aderidos foi encontrada dividindo-se o número de macrófagos aderidos pelo número total de células, multiplicando-se por 100.

3.7 Ensaio de fagocitose da levedura *Saccharomyces boulardii*

Para se verificar a interferência dos cimentos estudados no processo fagocítico, os macrófagos inflamatórios foram cultivados na presença ou não dos cimentos e, posteriormente, colocados em contato com a levedura *Saccharomyces boulardii* (Floratil, Merk S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), conforme explicitado a seguir.

Previamente, a levedura foi ressuspensa em PBS 1X, obtendo-se uma concentração de 1×10^7 células/mL. Em seguida, as leveduras foram mortas pelo calor, em autoclave a 100°C , por 10 minutos. Nos ensaios de fagocitose, a proporção de leveduras em relação ao número de células na cultura foi de 10 para 1 (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

Lamínulas de vidro, redondas e estéreis (GlassTécnica Importação e Comércio de Vidros, São Paulo, SP, Brasil), foram colocadas em poços de uma placa de cultura de 24 poços (Nuncclon™; Nalge Nunc International). Sobre essas lamínulas foram acrescentados 200µL da suspensão celular contendo 5×10^5 células/mL, em meio completo, incubando-se em estufa de CO_2 , a 37°C , por 2 horas. O meio foi removido e descartado, as células lavadas uma vez, com RPMI 1640, sem fenol vermelho, a 37°C . Posteriormente, acrescentou-se aos poços 1mL de RPMI 1640, sem fenol vermelho, a 37°C e 10µL da suspensão de *S. Boulardii*, mortas pelo calor, além dos capilares com e sem os cimentos. As placas foram incubadas por 1 hora em estufa de CO_2 à 37°C .

Após esse período, as leveduras não ligadas foram delicadamente removidas em três lavagens com meio novo de RPMI 1640, sem fenol vermelho, a 37°C . As lamínulas foram cobertas com 1mL de ácido tânico, a 1% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, São Paulo, Brasil), diluído em água destilada, durante 10 minutos. Este tratamento permitiu distinguir as leveduras presentes extra e intracelularmente. Foi realizada uma nova lavagem das células com meio RPMI 1640, sem fenol vermelho e, sobre cada lamínula foi colocada uma gota de soro bovino fetal para se evitar a cristalização do corante. Posteriormente, todo o líquido foi removido e lavado com água deionizada; as lamínulas foram coradas, de acordo com a recomendação do fabricante com panótico rápido (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, PR, Brasil). Após utilizar o

último corante, os poços foram lavados novamente com 300 µL água deionizada e deixados secar ao ambiente.

Após a coloração e secagem, as lamínulas foram coladas em lâminas, utilizando-se Entellan (MERK S.A., Darmstadt, Germany) e analisadas em microscopia óptica, em um aumento de 100X, sob imersão (Giamis *et al.*, 1992). Realizou-se a contagem de 200 macrófagos por lamínula. Determinou-se a porcentagem de macrófagos com leveduras fagocitadas, bem como o número da média de leveduras fagocitadas por cada macrófago.

3.7.1 Coloração com Panótico Rápido

As lamínulas foram imersas durante 5 segundos no Panótico nº 1, removendo-se o excesso; posteriormente, foram imersas durante 5 segundos no Panótico nº 2, removendo-se o excesso; e, por último, foram imersas durante 5 segundos no Panótico nº 3; e, finalmente lavadas com 300µL de água deionizada. Após a secagem, as lamínulas foram coladas em lâminas com Entellan.

3.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a avaliação da produção de ROS, utilizou-se uma placa de 96 poços. Nela foram adicionados os capilares na presença e na ausência dos cimentos estudados e a suspensão celular de 1×10^6 mL de células. Em metade das amostras foram colocados 50µl de Zymosan A. (*Saccharomyces cerevisiae*) (Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, EUA) em uma concentração de 1×10^9 partículas/mL, que foi usado como controle positivo para este ensaio (REZENDE *et al.*, 2007). Ainda foram adicionados 130µl de suspensão celular e 20µl de luminol. O Zymosan A foi diluído em PBS para se atingir uma concentração de 1×10^9 de partículas/mL e armazenado até o momento do experimento sob refrigeração (RIBEIRO SOBRINHO *et al.*, 2002; TRUSK *et al.*, 1978).

Nos poços sem o estímulo do Zymosan A, foram colocados 180µl de suspensão celular e 20µl de luminol. A solução de luminol foi preparada dissolvendo-se 1,77mg em 1mL de dimetil sulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada imediatamente após o contato com o estímulo de luminol por meio do

Lumicount™ por 4 horas (Packard Bioscience Company, Inc, Downers Grove, IL, EUA).

3.9 Análises estatísticas dos dados

As análises foram realizadas pelo programa Graphpad Prism 8.0. Utilizaram-se testes paramétricos, representado pela análise de variância (ANOVA), e não paramétricos, representados pelos testes Mann Whitney e Kruskal Wallis, de acordo com a presença ou não de normalidade. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4 ARTIGO

Assessment of the cytotoxicity, adherence, phagocyte activity, and production of reactive oxygen species of a new formulation of endodontic repair material calcium silicate-based in respect to macrophage activity

Francielen Oliveira Fonseca¹ - oliveiraf.fran@gmail.com

Betânia Canal Vasconcellos¹ - betaniavasconcellos7@gmail.com

Marcela Martins Costa¹ - celamartinsc@gmail.com

Francine Benetti¹ - francine_benetti@hotmail.com

Leda Quércia Viera² - lqviera@gmail.com

Warley Luciano Fonseca Tavares¹ - warleyt@hotmail.com

Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho¹ - sobrinho.bhz@gmail.com

¹Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

²Department of Biochemistry and Immunology, Biologic Science Institute, University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

Keywords: Biocompatibility, Macrophages, Endodontics, MTA, Bio-C Repair Íon⁺

Abstract

Aim: This study evaluated the effects of Bio-C Repair Ion⁺, a modified calcium silicate-based material, compared to its predecessor Bio-C Repair and MTA (mineral trioxide aggregate) on the activity of peritoneal inflammatory macrophages from murine. Cell viability, cell adhesion, phagocytosis, and ROS production were evaluated.

Methodology: C57BL/6 peritoneal inflammatory macrophages were cultured in the presence of the tested materials. The materials were inserted into the ends of sterile capillaries (\varnothing 3.52mm²) to standardize. The cell viability assay was performed by MTT assay, it was used the *S. boulardii* yeast to phagocytosis assay and the ROS assay was performed in the presence and absence of stimulation by Zymosan A. An ANOVA statistical test was performed ($P < 0.05$).

Results: The MTT assay revealed a significant decrease in cellular metabolism with Bio-C Repair Ion⁺ at 24 hours ($P < 0.05$) compared to the control, but no statistical differences with the other groups. There was no difference in adhesion and phagocytosis for the two materials concerning the control ($P > 0.05$). The presence of Zymosan A stimulated more outstanding production of ROS by macrophages. There was no significant difference between the unstimulated groups. The stimulated cells showed a statistical difference between the Bio-C Repair Ion⁺ cement and all other groups ($P > 0.05$).

Conclusion: The three materials: Bio-C Repair Ion⁺, successor to Bio-C Repair, both coming from the well-known MTA, showed similar results in the assays proposed in this *in vitro* study. The slight statistical differences reported in the viability and ROS production assays for the Bio-C Repair Ion⁺ group can be explained due its composition modified. Further *in vivo* investigations are

necessary to prove the good biological and mechanical properties that this material proposes.

Introduction

Advances in the treatment of critical endodontic clinical situations, such as perforations, root resorption, pulp capping, and induction of mineralized apical barrier formation, among others, are associated with advances in dental materials used in these scenarios, the so-called repair materials (Torabinejad M, 1995; Victoria-Escandell A, 2017). Once these materials are placed in direct contact with living cells, they ideally perform optimal biocompatibility characteristics and promote bioactivity (Gandolfi MG, 2015).

Since their creation, studies have shown the better performance of calcium silicate-based materials in these clinical applications, such as Mineral Trioxide Aggregate (MTA). MTA has hydrophilic properties, good radiopacity, low solubility, high pH, antimicrobial activity, and expandability (Torabinejad M, 1995; Tomson PL, 2007; Bin CV, 2012). However, the material depends on meticulous handling and is challenging to insert and condensate in cavities (Asgary S, 2008; Torabinejad M, 2018). However, due to the good biological, physical, and mechanical properties, new versions of calcium silicate-based materials have been developed to overcome these weaknesses of MTA, called bioceramic cement; an example is a Bio-C Repair (BCR) (Darvell & Wu, 2011; Valles et al., 2013; Camilleri et al., 2015).

Bioceramic cement comes from a process of refinement and improvement in the physicochemical qualities of MTA and is considered a cement state-of-the-art smart device with bioactive properties, promising in endodontics (Benetti F, 2019). These bioceramic compositions are based on calcium silicate that releases calcium ions, which are essential for tissue biomineralization. Although

thinking about creating a material that induces even more biomineralization, a new cement called Bio-C Repair Ion⁺ (BCRI⁺), still in an experimental phase, is cement with metallic particles in its composition, as the presence of metal ions promotes more significant bioactivity and induces complete regeneration and repair (Mohammadi H, 2014; Klein-Junior et al., 2021).

Since this cement is in close contact with periradicular tissues, it must not interfere with the cells present there and with the host's immune response, specifically in the activity of macrophages, which are one of the first cells to come into contact with antigens in the tissues (De Oliveira Mendes et al., 2003; Rezende et al., 2005; Taylor et al., 2005; Braga et al. 2014).

In recent literature, some in vitro studies compare BCR with MTA, but so few on the cytotoxicity of BCRI⁺ (Klein-Junior et al., 2021). In addition, no studies analyzed its adherence, phagocytosis, and reactive oxygen species (ROS) in macrophage cells.

This study aims to evaluate a murine's immune responses to inflammatory peritoneal macrophages when in contact with these materials. The null hypothesis was that these materials do not show significant differences in viability, adherence, phagocytosis, and production of ROs when compared to MTA.

Material and methods

Animals

Female C57BL/6 murine, born between 4 to 8 weeks, provided by vivarium CEBIO-UFMG (Belo Horizonte, MG, Brazil), were selected. They were kept in appropriate cages with control of temperature, and luminosity, containing feed

and water ad libitum. The research protocol was authorized by the animal research and ethics committee (CEUA-UFMG 350/2019).

Macrophages

Peritoneal inflammatory macrophages were obtained from the murine five days after the peritoneal injection of 0.2 mL of 3% sterile thioglycolate containing 1% sterile agar (Biobras S.A.®, Montes Claros, MG, Brazil). The animals were sacrificed, and 1 mL buffer solution was injected into their peritoneal cavities with a syringe. The highest content possible was aspirated. The cells were centrifuged at 350 rpm for 10 min, at 4°C, when the supernatant was discarded. Cells were resuspended and counted under light microscopy in a Neubauer chamber. More than 90% of them had morphological characteristics of macrophages (Braga et al., 2014). The final cell concentration was according to each assay; viability by MTT and adherence used 1×10^6 cells, and phagocytosis and ROS used 5×10^5 cells.

Materials

Three repair types of cement were chosen: MTA, Bio-c Repair, and Bio-C Repair Íon⁺ (all from Angelus, Londrina, PR, Brazil) (Table 01). The materials were inserted into the ends of sterile capillaries ($\varnothing 3.52 \text{ mm}^2$) and stored in a 6-well plate under laminar flow. Subsequently, they were placed in contact with the cell suspension. Empty capillaries were used as a negative control group (de Oliveira Mendes et al., 2003).

<i>Cement</i>	<i>Composition</i>	<i>Setting time</i>
<i>Bio-C Repair (Angelus)</i>	CaSiO ₃ , CaAl ₂ O ₄ , CaO, ZrO ₂ , Fe ₂ O ₃ , SiO ₂ , and dispersing agent.	≤120 min
<i>Bio-C Repair Ion (Angelus)</i>	CaSiO ₃ , MgO ₃ Si, CaO, ZrO ₂ , SiO ₂ , setting agents, and dispersing agent.	≤120 min
<i>MTA Angelus</i>	Powder: 3CaO.SiO ₂ , 2CaO.SiO ₂ , 3CaO.Al ₂ , CaO, CaWO ₄ . Liquid: distilled water	15 min

Table 01. Abbreviations: CaSiO₃ - calcium silicate; CaAl₂O₄ - calcium aluminate; CaO - calcium oxide; ZrO₂ - zirconium oxide; Fe₂O₃ - iron oxide; SiO₂ - silicon dioxide; MgO₃Si - magnesium silicate; 3CaO.SiO₂ - tricalcium silicate; 2CaO.SiO₂ - dicalcium silicate; 3CaO.Al₂ - tricalcium aluminate; CaWO₄ - calcium tungstate.

Cell viability analysis

Cell viability analysis was performed in triplicate at 24, 48, and 72 hours by MTT assay using 12 wells of a 96-well plate (Nunclon™) containing the capillaries and 200µL of cell suspension. After incubation at the specified times, the capillaries were removed, and the wells were washed with PBS 1X. Then the MTT solution was added, and the reading was performed in a microscopy reader (Bio-Rad, 2550, Hercules, USA 2014) (Braga et al., 2014).

Cell adherence assay

The cell adhesion assay was performed by adding 1mL of the cell suspension to sterile polypropylene tubes with the capillaries (Corning, MA, England). After 2 hours of incubation (37°C), the suspension was homogenized by vortexing, and 20µL aliquots of each sample were placed in Newbauer chambers for storage in humidified Petri dishes. After a new incubation for 18 hours, a count of adherent or non-adherent macrophages was performed by light microscopy. The result was expressed in % (Lee et al., 1993).

Phagocytosis analysis

In 24-well culture plates (Nunclon, Nalge Nunc International, Miami, FL, USA) 200µL of the cell suspension were incubated for 2 hours. A sterile round glass coverslip was placed in each well. Non-adherent cells were removed by washing

with a complete warm medium; afterward, 10^7 CFU of *Saccharomyces boulardii* (Floratil; Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and capillaries with or without sealers were added to the medium, and plates were incubated for 1 hour. Then, the plates were washed out with phenol red-free RPMI 1640 and subsequently filled with 1mL of this same substance, in addition to the cement-containing capillaries and 10 μ L of *S. boulardii* suspension at 10^7 cells/mL (Floratil®; Merck SA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Unbound yeast cells were removed by washing with a complete medium, and the coverslips were covered for 1 min with 1mL of tannic acid at 1% (Merk) so that extracellular and intracellular yeast cells could be counted. One drop of fetal calf serum was applied to each coverslip. The dried coverslips were stained with Panotico Rapido (Laborclin Ltd, Pinhais, PR, Brazil) and glued to microscope glass slides with Entellan (Merk®) (de Oliveira Mendes et al., 2003; Braga et al., 2015). The coverslips were analyzed under optical microscopy in oil immersion at 100x magnification, through which a minimum of 200 macrophages were counted, and the percentage of macrophages that phagocytosed *S. boulardii* and the average number of yeasts phagocytosed by macrophages were evaluated (Giaimis et al., 1992; Rezende et al., 2007).

Reactive oxygen species assay

ROS was assayed by adding Zymosan A from *S. cerevisiae* to the culture cells at 10^9 particles/mL concentration. A 96-well plate containing capillaries with or without materials, 50 μ L of Zimosan A, 130 μ L of cell suspension, and 20 μ L of luminol was used. In the wells without Zymosan A stimulation, the capillaries were added, 180 μ L of cell suspension and 20 μ L of luminol. The plate was read on Lumicount™ (Packard Bioscience Company, Inc, Downers Grove, IL, USA).

Statistical analysis

The results were analyzed using GraphPad Prism 8.0, in which the ANOVA test (multiple comparisons). The proposed analyses were considered significant when ($P < 0.05$).

Results

Cell Viability

The cytotoxic effects of materials by the MTT assay are demonstrated in Figure 1. It was observed at 24 hrs that Bio-C Repair Ion^+ cement presented statistically less viability than the control cells ($P < 0.05$), but showed no statistical difference to Bio-C Repair and MTA. No statistical differences were observed at 48 and 72 hrs between cells stimulated by all types of cement and the control. Mean cell viability for this assay was greater than 85% in all macrophage cultures.

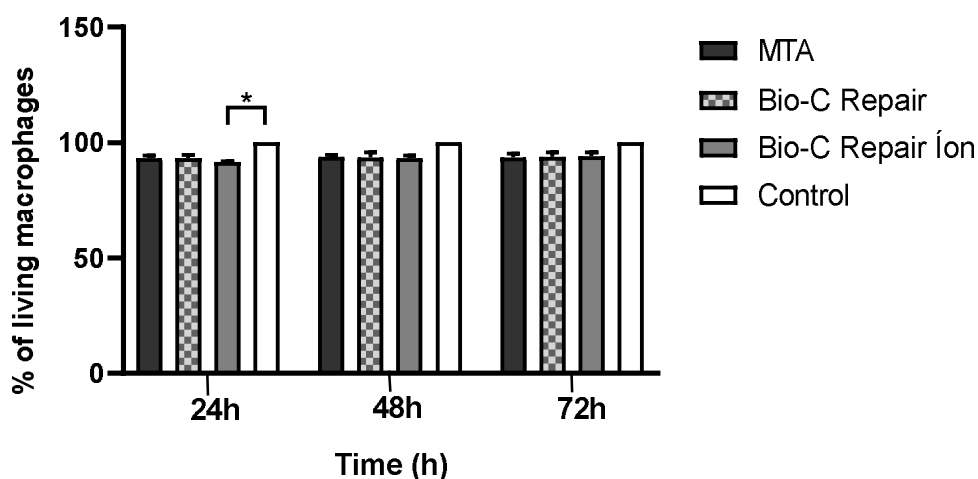


Figure 1: Percentage of living macrophages after MTT assay with capillaries containing the materials and control group, at intervals of 24, 48, and 72 hours. The bars represent the means of 2 experiments performed independently in triplicates, and the lines represent the standard deviations of the means. (*) Indicates the statistical difference between groups ($P > 0.05$ by ANOVA test).

Adherence of macrophages

Macrophage cell adhesions were similar between all sealers and control ($P < 0.05$) (Figure 2).

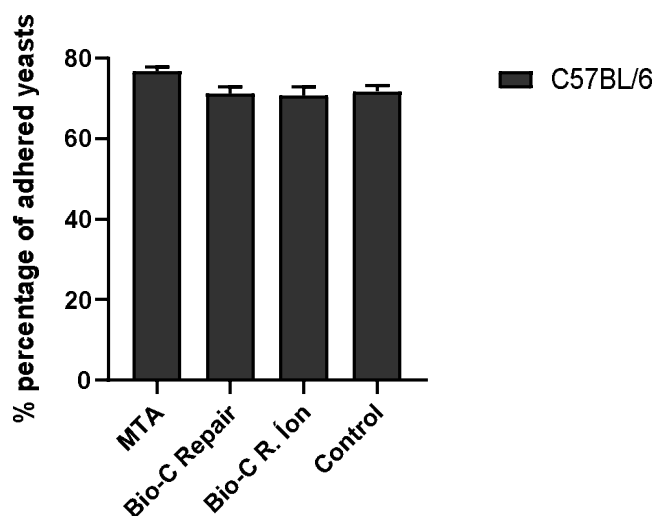


Figure 2: Percentage of adherent macrophages from C57BL/6 murine after incubation in the presence or absence of capillaries containing sealers. The control samples were cultured with empty capillaries. The bars represent the means of 3 experiments performed in duplicate. The lines represent the standard errors of the means ($P > 0.05$).

Yeast phagocytosis activity

The ability of the macrophages to uptake *S. boulardii* in the presence or absence of sealers was assayed. The analysis of the percentage of macrophages with phagocytosed yeasts is represented by Figure 3 (A). There was no statistical difference between the groups. The average number of yeasts phagocytosed by each macrophage is shown in Figure 3 (B). There was also no statistical difference between the sealers and the control.

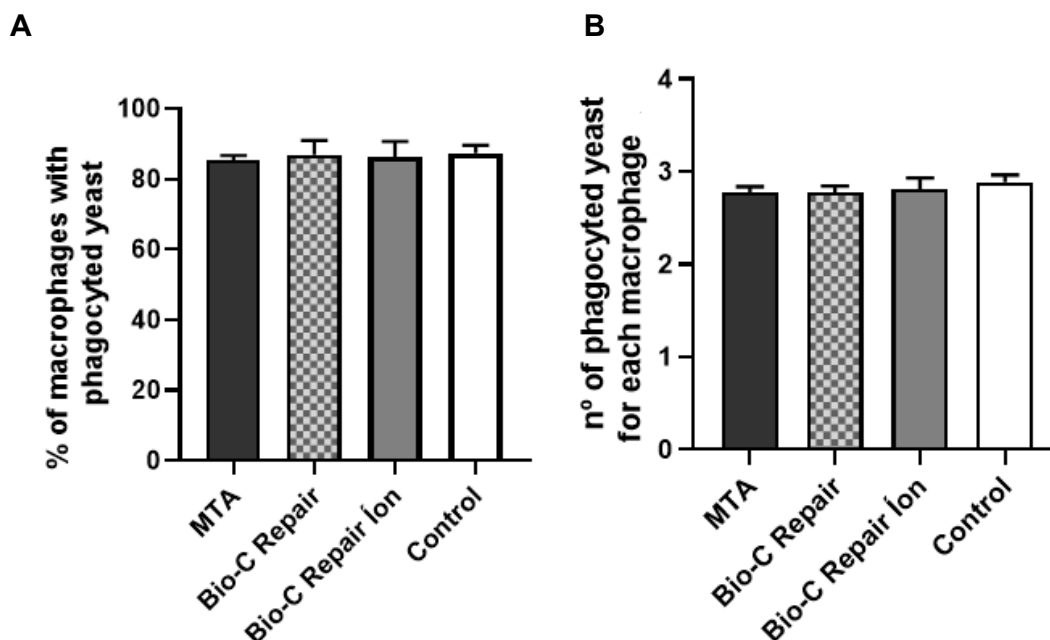


Figure 3: Percentage (A) of macrophages that phagocytosed yeasts and average number (B) of yeast cells per macrophage from C57BL/6 murine after incubation in culture plates with capillaries containing the sealers. The bars represent the means of three experiments performed in duplicate. The lines represent the standard errors of the means. There was no statistical difference between the sealer and the control ($P > 0.05$).

Production of reactive oxygen species (ROS)

ROS production is demonstrated in Figure 4. The addition of Zymosan induced significantly higher levels of ROS. In stimulated cells, Bio-C Repair Ion⁺ exhibited a significantly higher ROS production than MTA, Bio-C Repair, and control ($P < 0.05$). No difference was observed in non-stimulated macrophage cells between sealers and control.

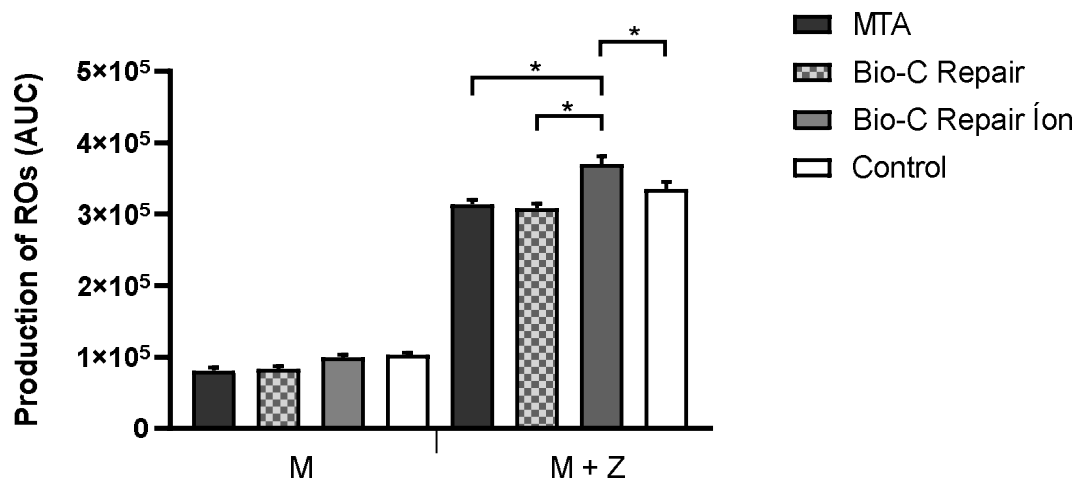


Figure 4: Production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages from C57BL/6 murine, stimulated or not stimulated with Zymosan A in the presence or absence of sealers. The bars represent the means of 2 experiments performed in triplicate, and the lines represent the standard errors of the means. (*) Indicates the difference between groups ($P < 0.05$ by ANOVA test).

Discussion

Endodontic treatment in critical situations can require materials in direct contact with the periradicular tissue. The success depends on the correct debridement of the site and an effective filling of the space. The chosen material may prevent reinfection, creates a resistant barrier, not attacks the tissues, and promotes healing. In this way, the bioactivity and, especially, the biocompatibility of the material, maybe one of its main requirements (Ricucci D, Siqueira J. F. Jr., 2010; Braga, J. M, 2015).

Macrophages are important cells of our immune system that act in the innate and adaptive defense response. They are responsible for phagocytosing and digesting microorganisms and foreign substances (Medzhitov R, 1997). Moreover, macrophages recruit other cells to the site of infection and produce cytokines and chemokines (Taylor et al., 2005, Hasturk et al., 2012).

This study evaluated the effects of BCR and its successor BCRI+ on murine macrophage cells from murine type B57BL/6, comparing the results with those obtained by MTA sealer. Several studies have already shown that MTA is the gold standard control for other materials due to its excellent biocompatibility (Parirokh; Torabinejad, 2018; Rezende et al., 2005; Rezende et al., 2007). Then, the viability, adherence, phagocytic, and ROS production were assayed.

In every cell study, cells are expected to remain viable during the experiments. MTA Angelus and BCR promoted similar macrophage viability in all analyzed times. However, lower cell viability was observed in BCRI+ at 24 hours compared to the control group, but there was no statistical difference comparing with BCR and MTA. In a study using L929 fibroblast cultures it was also demonstrated similar cell viability to Bio-C Repair and MTA (Benetti et al., 2019). These authors also demonstrated that Bio-C Repair could induce biomineralization as MTA. Similar to our results, using fibroblast cells, Klein-Junior et al. (2020) demonstrated the Bio-C Repair Ion⁺ presented impaired cell metabolism than Bio-C Repair, but it is important to point out that in this author's studies the contact area of the material with the cell culture was greater. Adding metal ions to the composition of Bio-C Repair Ion⁺ aims to increase the material's bioactivity, improving cell proliferation and differentiation to mineralize tissues (Wu CT & Chang J, 2013). On the other hand, Mohammadi et al. (2014) have demonstrated that metal ions in large amounts may cause cell toxicity, which might explain the results observed in this study.

Macrophages initiate their kinetics of activity in the immune system by adhering to substrate (Fujiwara & Kobayashi, 2005). In this study, none of the tested materials interfered with cell adhesion, highlighting the biocompatible

characteristics. Accordingly, previously similar results from macrophage cell analyses for MTA Angelus were described elsewhere (Rezende et al., 2007, Braga et al., 2015).

After macrophage adhesion, phagocytosis begins. It is a primary mechanism that supports innate and acquired immunity responses (Strauss, 2010; Pacheco, 2012). Therefore, repair materials may not alter the macrophage functions, not suppressing their clearance activity. No chosen materials inhibited the macrophage phagocyte activities, observing a similar average number of phagocytosed yeasts per cell. Close macrophage phagocyte activity was previously demonstrated regarding MTA Angelus (Rezende et al., 2007).

Macrophages stimulate biochemical and metabolic mechanisms to release cytokine and ROS production, improving microbial degradation. The macrophage cultures stimulated by Zimozan A presented higher ROS production, as demonstrated by others (Rezende et al., 2007; Braga et al., 2014). Here, the BCRI+ sealer induced significantly higher ROS levels in cell cultures than the other sealers and control. The greater the induction of ROS, the more significant the elimination of pathogens becomes (Paiva, 2014). Maybe, it is related to the high release of metal ions by this sealer. In addition to being involved in microbial elimination, ROS are responsible for various cellular processes, such as cell survival and growth, proliferation, differentiation, cell senescence, and apoptosis (Hancock et al., 2001).

The in vitro cell approaches are the first level of material biocompatibility tests. This study showed that Bio-C Repair Ion+ presents biocompatibility actions almost similar to Bio-C Repair and MTA, probably due to their proximate composition. Can we infer that differences concerning cell viability and ROS

production may be related to the metal ion included in the composition of the Bio-C Repair Ion+. Further well-tested in vivo animal models may be used to analyze whether the results interfere with the Bio-C Repair Ion+ clinical behavior. Acknowledgments

This work received financial support from FAPEMIG, CAPES, and CNPq. The authors have no conflict of interest.

References

Torabinejad, M, Hong, CU, McDonald, F, Ford, TP (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics*, **21**, 349-353.

Victoria-Escandell, A, Ibañez-Cabellos, JS, de Cutanda, SBS, Berenguer-Pascual, E, Beltrán-García, J, García-López, E, Monterde, M (2017) Cellular responses in human dental pulp stem cells treated with three endodontic materials. *Stem cells international*, 2017.

Gandolfi, MG, Spagnuolo, G, Siboni, F, Procino, A, Riviaccio, V, Pelliccioni, GA, Rengo, S. (2015) Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clinical oral investigations*, **19**, 2075-2089.

Tomson, PL, Grover, LM, Lumley, PJ, Sloan, AJ, Smith, AJ, Cooper, PR (2007) Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *Journal of Dentistry*, **35**, 636-642.

Bin, CV, Valera, MC, Camargo, SE, Rabelo, SB, Silva, GO, Balducci, I, Camargo, CHR (2012) Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*, **38**, 495-500.

Asgary, S, Shahabi, S, Jafarzadeh, T, Amini, S, Kheirieh, S (2008) The properties of a new endodontic material. *Journal of endodontics*, **34**, 990-993.

Torabinejad, M, Parirokh, M, & Dummer, PM (2018) Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part II: other clinical applications and complications. *International endodontic journal*, **51**, 284-317.

Darvell, BW, & Wu, RCT (2011) “MTA” — An hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dental Materials*, **27**, 407-422.

Vallés, M, Mercadé, M, Duran-Sindreu, F, Bourdelande, JL, Roig, M (2013) Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. *Journal of endodontics*, **39**, 525-528.

Camilleri, J (2015) Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *Journal of endodontics*, **41**, 1139-1145.

Benetti, F, Queiroz, ÍODA, Cosme-Silva, L, Conti, LC, Oliveira, SHPD, Cintra, LTA (2019) Cytotoxicity, biocompatibility and biomineralization of a new ready for-use bioceramic repair material. *Brazilian dental journal*, **30**, 325-332.

Mohammadi, H, Hafezi, M, Nezafati, N, Heasarki, S, Nadernezhad, A, Ghazanfari, SMH, & Sepantafar, M (2014). Bioinorganics in bioactive calcium silicate ceramics for bone tissue repair: bioactivity and biological properties. *J. Ceram. Sci. Technol*, **5**, 1-12.

Klein-Junior, CA, Zimmer, R, Dobler, T, Oliveira, V, Marinowic, DR, Özkömür, A, & Reston, EG (2021) Cytotoxicity assessment of Bio-C Repair Íon⁺: A new calcium silicate-based cement. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, **15**, 152.

De Oliveira Mendes ST, Ribeiro Sobrinho AP, Carvalho AT, Côrtes MIS, Vieira LQ (2003) In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *Journal of Endodontics*, **29**, 95-9.

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

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology* **23**, 901–44.

Braga JM, Oliveira RR, Martins RC, Ribeiro Sobrinho A (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. *Journal of Endodontics* **47**, 909-19.

Lee, SJ, Monsef, M, Torabinejad, M (1993) Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of endodontics*, **19**, 541-544.

Giaimis, J, Lombard, Y, Makaya-Kumba, M, Fonteneau, P, Poindron, P (1992) A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *Journal of immunological methods*, **154**, 185-193.

Ricucci, D, & Siqueira Jr, JF (2010). Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *Journal of endodontics*, **36**, 1-15.

Braga JM, Oliveira RR, Martins RC, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP (2015) Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. *Dental Traumatology* **31**, 390-395.

Medzhitov, R & Janeway, CA (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**, 295-298.

Hasturk, H, Kantarci, A, & Van Dyke, TE (2012) Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. *Frontiers in immunology*, **3**, 118.

Parirokh, M, & Torabinejad, M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *Journal of endodontics*, **36**, 16-27.

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.

Wu CT, Chang J. (2013) Silicate bioceramics for bone tissue regeneration. *J Inorg Mater* **28**, 29-39.

Fujiwara, N, Kobayashi, K (2005) Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, **4**, 281-286.

Strauss, R. R. (1980) Association of Some Metabolic Activities of Leukocytes with the Immune Response. In *Macrophages and Lymphocytes* (pp. 3-19). Springer, Boston, MA.

Pacheco, F. C. (2012) Prespectiva histórica da imunologia. *Fundamentos de imunologia-2*. Lisbon: Lidel Ed, 1-29.

Mosser, DM (2003) The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*, **73**, 209-212.

Paiva CN, & Bozza, MT (2014). Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxidants & redox signaling* **20**, 1000-1037.

Hancock, JT, R Desikan, SJ Neill, (2001) Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways. *Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification* **29**, 345-350.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo buscou elucidar a resposta imuno-inflamatória promovida por três materiais biocerâmicos quando em contato com macrófagos inflamatórios murinos da linhagem C57BL/6. Os materiais utilizados foram o MTA, o Bio-C Repair e o Bio-C Repair Ion⁺ (Angelus - Londrina, Paraná, Brazil).

Os testes de viabilidade e aderência celular, atividade fagocítica e produção de ROS demonstraram resultados similares entre os biocerâmicos avaliados, na presença ou ausência dos estímulos microbianos. Contudo, nos ensaios de viabilidade celular e produção de ROS, o material Bio-C Repair Ion⁺ apresentou diferenças estatisticamente significantes.

Concluimos que os materiais estudados se comportaram em geral de forma parecida por apresentarem composição bem semelhante. Por sua vez, as diferenças observadas quanto ao Bio-C Repair Ion⁺ podem estar relacionadas aos íons metálicos presentes em sua formulação. Futuramente, outros modelos de estudos devem ser utilizados para se confirmar as diferenças aqui observadas e se as mesmas interferem no comportamento clínico do Bio-C Repair Ion⁺.

REFERÊNCIAS

ANGELUS, Indústria Produtos Odontológicos LTDA (Londrina-PR/Brasil). **Bioceramics Bio-C® Sealer Ion+ e Bio-C® Repair Ion+: Technical information**, 2019, p.2-10.

BENETTI, F. *et al.* Cytotoxicity, biocompatibility and biomineralization of a new ready-for-use bioceramic repair material. **Brazilian dental journal**, v. 30, p. 325-332, 2019.

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. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 10, p. 909-19, Oct. 2014.

CAMILLERI, J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. **Journal of endodontics**, v. 41, n. 7, p. 1139-1145, 2015.

DARVELL, B.W.; WU, R.C.T. "MTA"— an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. **Dental Materials**, v. 27, n. 5, p. 407-422, 2011.

DE OLIVEIRA MENDES, S.T. *et al.* In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 2, p. 95-9, Feb. 2003.

DUARTE, M.A.H. *et al.* Arsenic release provided by MTA and Portland cement. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 99, n. 5, p. 648-650, 2005.

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

HARGREAVES K. M.; COHEN S. *Caminhos da Polpa*. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the american ceramic society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N.S. & BOCCACCINI, A.R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757-2774, 2011.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JÚNIOR J. F. *Endodontia: biologia e técnica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020.

MARCIANO, M.A. *et al.* Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 8, p. 1235-1240, 2014.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of leukocyte biology**, v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003.

PARIROKH, M. & TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 16-27, Jan. 2010.

PRATI, C. & GANDOLFI, M.G. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. **Dental materials**, v. 31, n. 4, p. 351-370, 2015.

REYES-CARMONA, J.F. *et al.* Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and White Portland cement with dentin in a phosphate containing fluid. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 731-36, May. 2009.

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. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 8, p. 603-11, Aug. 2007.

REZENDE, T.M. *et al.* Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 12, p. 896-903, Dec. 2005.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P. *et al.* Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. **Oral microbiology and Immunology**, v. 17, n. 6, p. 344-353, 2002.

TAY, F.R. *et al.* Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. **Journal of endodontics**, v. 33, n. 11, p. 1347-1351, 2007.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. & DUMMER, Paul MH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview—part II: other clinical applications and complications. **International endodontic journal**, v. 51, n. 3, p. 284-317, 2018.

VALLÉS, M. *et al.* Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate–based materials. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 4, p. 525-528, 2013.

VALLITTU, P.K. *et al.* Bioactive dental materials - Do they exist and what does bioactivity mean? **Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials**, v. 34, n. 5, p. 693-694, 2018.

ZAFAR, K. *et al.* Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. JPMA. **The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 70, n. 3, p. 497, 2020.

YUNNA, C. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, n. 15, Jun. 2020.