UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Marcela Martins Costa

INFLUÊNCIA DOS CIMENTOS BIOCERÂMICOS BIODENTINE E BIO-C REPAIR NAS RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS M1 E M2 DE MURINOS

Belo Horizonte
2020

Marcela Martins Costa

INFLUÊNCIA DOS CIMENTOS BIOCERÂMICOS BIODENTINE E BIO-C REPAIR NAS RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS M1 E M2 DE MURINOS

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
2020

Ficha Catalográfica

C837i 2020 T

Costa, Marcela Martins.
Influência dos cimentos biocerâmicos Biodentine e Bio-C Repair nas respostas de macrófagos M1 e M2 de murinos / Marcela Martins Costa. -- 2020.

48 f. : il.

Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.
Coorientador: Warley Luciano Fonseca Tavares.

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

1. Macrófagos. 2. Cimentos dentários. 3. Teste de materiais. 4. Citocinas. 5. Endodontia. 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

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

INFLUÊNCIA DOS CIMENTOS BIOCERÂMICOS BIODENTINE E BIO-C REPAIR NAS RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS M1 E M2 DE MURINOS

MARCELA MARTINS COSTA

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 06 de julho de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho - Orientador
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof. Warley Luciano Fonseca Tavares
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Júlia Mourão Braga Diniz
Faculdade Arnaldo

Prof. Frank Ferreira da Silveira
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Belo Horizonte, 06 de julho de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho**, **Professor do Magistério Superior**, em 13/11/2024, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Frank Ferreira Silveira**, **Usuário Externo**, em 13/11/2024, às 19:07, 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 **Julia Mourão Braga Diniz**, **Usuária Externa**, em 13/11/2024, às 23:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Warley Luciano Fonseca Tavares**, **Coordenador(a)**, em 18/11/2024, às 14:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3725831** e o código CRC **5600950A**.

Dedico esse trabalho antes de tudo a Deus, aos meus pais Wellington e Adriana, a minha irmã Gabriela e ao meu noivo Eduardo, fontes inquestionáveis de amor e que de forma direta ou indireta me guiaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida, pela saúde, pela família maravilhosa que tenho e pela força de enfrentar cada dia com mais otimismo e fé!

Agradeço aos meus pais Wellington e Adriana por todo apoio e amor incondicional, pelos ensinamentos de vida, e por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Obrigada por serem exemplo de luta e determinação. Com vocês tudo faz mais sentido, vocês são minha vida!

A minha irmã Gabriela que sempre esteve do meu lado me incentivando e torcendo pelo meu sucesso. Obrigada por toda cumplicidade e convivência, você é peça fundamental na minha vida!

Ao meu noivo Eduardo, meu melhor amigo e companheiro, motivação para todas as minhas buscas, por me incentivar a fazer o mestrado e sempre acreditar em mim. Sem você nada disso seria possível. Amo você!

Agradeço a toda minha família, pelo cuidado, atenção e presença constante!

Agradeço ao meu orientador professor Doutor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pelo exemplo de competência e dedicação, por transmitir e compartilhar de todo o seu conhecimento.

Ao meu coorientador professor Doutor Warley Luciano Fonseca Tavares pela sabedoria e por exercer com maestria sua função em orientar. Obrigada pela atenção, equilíbrio, paciência, estímulo, disponibilidade, e por se fazer presente em vários momentos da minha trajetória como endodontista, seja no aperfeiçoamento, especialização e agora no mestrado.

Agradeço aos outros professores da pós-graduação Profa. Dra. Ana Cecília Diniz Viana e Profa. Dra. Juliana Vilela Bastos por todo conhecimento compartilhado.

As amigas da UFMG Layara e Betânia pela disponibilidade em todas as etapas deste trabalho, a Fran pela amizade construída ao longo dessa caminhada e por fazer do laboratório um ambiente mais leve. Obrigada pelas ajudas nos experimentos, sem vocês esse trabalho não seria possível!

Agradeço aos amigos da pós-graduação, em especial à Roberta, que foi minha dupla de mestrado. Obrigada pela amizade, pelo incentivo, conselhos e os momentos de alegria.

Aos meus colegas do laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (ICB-UFMG) em especial ao Leo pela paciência e ajuda nos trabalhos desta pesquisa.

A empresa Angelus®, por fornecer as amostras que permitiram o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que, de alguma forma contribuíram e torceram para meu êxito diante de mais um desafio.

Muito obrigada!

“Mude, mas comece devagar, porque a direção é mais importante que a velocidade.”

Clarisse Lispector

RESUMO

Os cimentos biocerâmicos podem ser utilizados na endodontia como materiais reparadores e apresentam propriedades adicionais em relação ao primeiro biocerâmico, o MTA, como melhor escoamento e manipulação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos cimentos biocerâmicos: Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França), Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) e MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) - utilizado como padrão ouro - nas respostas dos macrófagos M1 e M2 de murinos quanto à viabilidade celular, capacidade de aderência, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio.. A pesquisa foi submetida ao Comitê de ética e pesquisa em animais (CEUA-UFMG) e realizada no laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Instituto de Ciências biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizadas duas linhagens de camundongos: C57BL/6, para recuperação dos macrófagos peritoneais M1, e BALB/c, para recuperação dos macrófagos peritoneais M2. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA ($p < 0,05$). Houve menor viabilidade celular em relação ao controle nas culturas de 24 hs de macrófagos M1 e M2 tratadas com o Biodentine ($p<0,05$), pelos métodos do MTT e exclusão do azul de tripan. Em 72h, todos os cimentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p< 0,05$), nas culturas de células M1, quanto à viabilidade celular, analisada pelo método do azul de tripan. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na adesão celular entre os dois tipos de macrófagos tratados pelos diferentes cimentos. Observou-se, no ensaio de fagocitose, que os macrófagos M1 apresentavam maior número médio de leveduras intracelulares que os macrófagos M2 ($p< 0,05$). Em relação à produção de espécies reativas de oxigênio, macrófagos M1 tratados com o Biodentine induziram maior produção quando comparado aos demais cimentos, na presença do zymosan A. ($p< 0,05$). Ao se comparar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) entre os dois tipos de macrófagos, observou-se uma maior produção pelas células M1 ($p<0,05$). Concluiu-se que, os materiais biocerâmicos reparadores apresentaram respostas semelhantes ao MTA, enfatizando a excelente biocompatibilidade dos cimentos Biodentine e Bio- C Repair.

Palavras-chave: macrófagos; cimentos biocerâmicos; biocompatibilidade; citocinas; endodontia.

ABSTRACT

Influence of Biodentine and Bio-C Repair Bioceramic Cements in responses of murine´s M1 and M2 macrophages

Bioceramic cements can be used in endodontics as repair materials and have additional properties in relation to the first bioceramic, MTA, such as better flow and handling. This work aimed to evaluate the effect of bioceramic cements: Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, France), Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brazil) and MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brazil) - used as the gold standard - in the responses of murine M1 and M2 macrophages regarding cell viability, adherence capacity, phagocytosis and production of reactive oxygen species. The research was submitted to the Ethics and Research Committee on Animals (CEUA-UFMG) and was carried out in the laboratory of Gnotobiology and Immunology of the Institute of Biological Sciences (ICB) of the Federal University of Minas Gerais. Two strains of mice were used: C57BL / 6, for recovery of peritoneal macrophages M1, and BALB / c, for recovery of peritoneal macrophages M2. The data were analyzed using the ANOVA test ($p < 0.05$). There was less cell viability compared to control in the 24-hour cultures of M1 and M2 macrophages treated with Biodentine ($p < 0.05$), using MTT methods and trypan blue exclusion. In 72h, all cements showed significant difference in relation to the control ($p < 0.05$), in the cultures of M1 cells, regarding cell viability, analyzed by the trypan blue method. There was no significant difference ($p > 0.05$) in cell adhesion between the two types of macrophages treated by the different cements. It was observed in the phagocytosis assay that M1 macrophages had a higher mean number of intracellular yeasts than M2 macrophages ($p < 0.05$). Regarding the production of reactive oxygen species, M1 macrophages treated with Biodentine induced greater production when compared to other cements, in the presence of zymosan A. ($p < 0.05$). When comparing the production of reactive oxygen species (ROS) between the two types of macrophages, a greater production by M1 cells was observed ($p < 0.05$). It was concluded that the repairing bioceramic materials presented similar responses to MTA, emphasizing the excellent biocompatibility of Biodentine and Bio-C Repair cements.

Keywords: macrophages; bioceramic cements; biocompatibility; cytokines; endodontics.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Porcentagem de macrófagos M1 (a) e M2 (b) após o ensaio de viabilidade celular MTT com capilares contendo os biocerâmicos e grupo controle, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas..... 31

Figura 2 – Porcentagem de macrófagos M1 (a) e M2 (b) após o ensaio de viabilidade celular com o método de exclusão do azul de tripan, após contato direto com os biocerâmicos e grupo controle, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas..... 31

Figura 3 – Porcentagem da aderência celular em M1 (a) e de M2 (b) com capilares contendo os biocerâmicos e o grupo controle..... 32

Figura 4 – Porcentagem de macrófagos com levedura fagocitada M1(a) e M2(b). Número médio de levedura fagocitada por cada macrófago M1(c) e M2(d)..... 33

Figura 5 – Média da luminescência expressa pela área sob a curva de produção de ROs pelos macrófagos M1 (a) e M2 (b) após contato com os biocerâmicos e o grupo controle. M indica culturas de macrófagos e M + Z indica culturas de macrófagos na presença do Zimosan A.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
2CaO SiO2	Silicato dicálcio
3CaO SiO2	Silicato tricálcico
Ca2+	Íons cálcio
CaSO4	Sulfato de cálcio
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comitê de ética e pesquisa em animais
CO2	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
H2O	Água
ICB	Instituto de ciências biológicas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRM	Restauração provisória de longa duração
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPS	Lipopolissacáridos
M1	Macrófago do tipo 1
M2	Macrófago do tipo 2
MHC	Molécula de histocompatibilidade
MTA	Agregado trióxido mineral
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NaNo2	Nitrito de sódio
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NOD	Receptores similares ao domínio de oligomerização
OH-	Íon hidroxila
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBS	Tampão fosfato-salino
PG	Prostaglandina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCR	Sistema de canais radiculares
SDS	Sodium dodecil sulfate
TCRs	Receptores celulares de células T
TGF	Fator de crescimento transformante
Th	Célula T-helper
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....14

2 OBJETIVOS.....18

2.1 Objetivos gerais.....18
2.2 Objetivos específicos 18

3 METODOLOGIA EXPANDIDA.....19
3.1 Animais.....20
3.2 Microrganismos.....20
3.3 Preparo dos cimentos reparadores.....20
3.4 Obtenção e cultura de células peritoneais inflamatórias.....21
3.5 Viabilidade celular.....22
3.6 Aderência celular.....23
3.7 Ensaio de fagocitose da levedura Saccharomyces boulardii.....23
3.7.1 Coloração com panótico rápido.....25
3.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROs).....25
3.9 Análises estatísticas dos dados.....25

4 ARTIGO CIENTÍFICO.....26

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....45

REFERÊNCIAS.....46

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico objetiva, através do preparo mecânico-químico, a remoção completa dos tecidos pulpares e/ou necróticos, com subsequente modelagem, limpeza e selamento tridimensional com materiais obturadores. A chave para o sucesso é realizar o debridamento e a neutralização de qualquer tecido, bactéria ou subproduto inflamatório no sistema do canal radicular (TABASSUM E KHAN, 2016).

Apesar do alto índice de sucesso relatados em 80%, em muitos casos nos deparamos com complicações que envolvem perfurações, reabsorções, e até mesmo dentes com rizogênese incompleta (HENRIQUES 2011; PRATI & GANDOLFI, 2015), que vão necessitar do uso de um material reparador para promover um adequado selamento do canal radicular.

Por ficar em íntimo contato com os tecidos perirradiculares, o material ideal para ser utilizado nessas situações, deve ser biocompatível, não interferir nos processos biológicos do hospedeiro, não ser reabsorvível, possuir boa estabilidade dimensional, facilidade de manuseio e inserção, ser radiopaco e tolerante à umidade (BEATRICE *et al.*, 2009).

Assim surgiu o primeiro cimento biocerâmico utilizado na endodontia, o agregado de trióxido mineral (MTA). Desde sua primeira descrição por *Lee et al.* (1993), o MTA é utilizado em aplicações cirúrgicas e não cirúrgicas. Na endodontia é frequentemente utilizado como material reparador, vedando comunicações existentes entre um dente e as suas superfícies externas (TORABINEJAD *et al.*, 1993; TORABINEJAD E CHIVIAN, 1999). Por apresentar características positivas como elevada biocompatibilidade, bioatividade, estímulo à neoformação de dentina, cemento e osso, atividade antimicrobiana, tomada de presa na presença de umidade, o MTA tornou-se popular entre clínicos e especialistas em endodontia. Entretanto, desvantagens, como dificuldade na manipulação e inserção, consistência arenosa, longo tempo de presa, possibilidade de descoloração da estrutura dentária, têm estimulado à investigação de novos biocerâmicos reparadores (CAMILLERI *et al.*, 2015; DARVELL & WU, 2011; MA *et al.*, 2011; VALLÉS *et al.*, 2013).

Podemos citar como exemplo o Cimento Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França), e o cimento Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), que possuem um pH alcalino, apresentam uma alta liberação de íons cálcio e boa

radiopacidade (BORGES *et al*., 2012; CANDEIRO *et al*., 2016). O Biodentine é um material bioativo de silicato tricálcico, encontrado no mercado como uma formulação pré-dosada de pó e líquido, a ser utilizado como um substituto da dentina. Apresenta resultados satisfatórios em relação à sua atividade antimicrobiana, genotoxicidade e características físicas, além de não ser citotóxico quando avaliado em culturas de fibroblastos recuperados do ligamento periodontal (ESCOBAR-GARCÍA, 2016; HAN & OKIJI, 2013; NOWICKA *et al*., 2013). O Bio-C Repair, por ser um cimento pronto pra uso, encontrado na consistência putty (pesada), necessita da umidade do local da aplicação para iniciar seu processo de hidratação, liberação de íons, biomineralização e reparo. Apesar de ter sido lançado recentemente no Brasil pela empresa Ângelus, em 2019, já foi observado que esse cimento apresenta citocompatibilidade, biocompatibilidade e induz a biomineralização semelhante ao MTA (BENETTI, 2019).

Como esses cimentos são utilizados em contato com os tecidos perirradiculares, é extremamente importante que não interfiram na resposta imunológica do paciente (REZENDE *et al.*, 2005). Os tecidos pulpares e perirradiculares exibem grande quantidade de células imunocompetentes, dentre as quais os macrófagos são as mais predominantes (KAWASHIMA *et al.*, 1996; REZENDE *et al.,* 2005). Apesar de apresentarem resultados satisfatórios em relação à biocompatibilidade e propriedades físicas, poucos estudos têm relatado a interação dos novos biocerâmicos na resposta imunológica periapical, principalmente na atividade de macrófagos, por serem as primeiras células a entrarem em contato com antígenos e desempenharem papel principal na patogênese da inflamação.

Os macrófagos apresentam papel relevante, tanto na imunidade inata, responsáveis pela fagocitose, quanto na imunidade adaptativa, apresentando a função de apresentadores de antígeno. Primeiramente, estas células aderem-se a um substrato para, posteriormente, iniciar o processo fagocítico. Uma vez estimulados,, os macrófagos reagem contra os patógenos produzindo óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (MOSSER, 2003). Após esse processo, citocinas são liberadas para promover a iniciação, perpetuação, e o direcionamento da resposta imune (METZGER, 2000).

Vale lembrar que os macrófagos podem ser ativados por diferentes vias, chamadas de clássica e alternativa (SOLINAS *et al*., 2009). Diante disso, são sub-divididos em macrófagos do tipo M1 e M2, baseados em sua relação de receptores,

função, produção de citocinas e resposta. A proporção entre os subtipos celulares deve se encontrar em um estado de equilíbrio para um conveniente funcionamento do sistema imunológico (METZGER, 2000; MOSSER, 2003; REZENDE *et al.*, 2005).

O subtipo M1 desempenha um papel relevante na proteção a patógenos intracelulares e a células cancerígenas em virtude da sua grande atividade citotóxica e da resposta imune que desencadeia. A partir da ativação pela via clássica, participam como indutores da inflamação, e são mediados por estímulos como interferon gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), receptores do tipo Toll (TLR) e lipopolissacáridos (LPS) (GEISSMANN *et al.*, 2010; SOLINAS *et al.*, 2009;). Apresentam ainda, não só alta capacidade fagocítica, como também alta capacidade de espraiar, de aderir, de apresentar antígenos às células T; de produzirem elevadas concentrações de IL-12 e IL-23, além de NO e ROS. Como consequência, seu metabolismo se torna mais eficiente na eliminação de microrganismos por apresentar um direcionamento de respostas do tipo 1 (pro-inflamatório) (BASTOS *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2002; MILLS *et al.*, 2000; MOSSER, 2003; REZENDE *et al.*, 2005).

A ativação alternativa vincula-se ao macrófago do subtipo M2, responsável por promover a limpeza de detritos e os processos cicatriciais. Essa ativação ocorre quando os macrófagos estão expostos a um microambiente em que predominam citocinas, como a IL-4, IL-13, IL-10, e TGF-β, e derivados do ácido araquidônico, como as PGE2 (prostaglandina E2). Algumas alterações nas vias metabólicas podem ser observadas, como no metabolismo de arginina, levando à conversão de ornitina e poliamina, em vez de citrulina, e NO. Portanto, apresentam um padrão de resposta do tipo 2 (anti-inflamatório), produzindo altas concentrações de IL-10 e TGF-β e baixa produção de NO, ROS e de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-1, TNF e IL-6 (BASTOS *et al.* 2002, OBEID *et al.*, 2013; REZENDE *et al.* 2007; SOLINAS *et al.*, 2009).

Já foi observado que algumas linhagens de camundongos, podem apresentar esses tipos de perfis de respostas predominantemente. Como é o caso do C57BL/6 que apresenta maior perfil de resposta inflamatória em comparação aos animais BALB/c, ou seja, os primeiros apresentam maior quantidade de células produtoras de IFN-γ. Diante disso, podemos classificar os camundongos C57/BL6 sendo representantes dos macrófagos do tipo M1, e o BALB/c representantes do macrófago do tipo M2 (ORECCHIONI, 2019). Nesse contexto é interessante usar a abordagem

do background genético de diferentes linhagens de camundongos para entender melhor os mecanismos envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro.

Amplamente descrito, o MTA apresenta resultados satisfatórios quanto à viabilidade, aderência, fagocitose, e produção de ROS e NO e a não interferência na produção e secreção das citocinas TNF, IL-12 e IL-10, pelos macrófagos M1 e M2 (REZENDE *et al.*, 2005, 2007). Assim, tendo em vista a importância dessas células nos processos inflamatórios e cicatriciais que ocorrem nos tecidos perirradiculares, é relevante conhecer a atividade e resposta de macrófagos inflamatórios M1 e M2 na presença de cimentos biocerâmicos atualmente disponíveis no mercado e utilizados em procedimentos reparadores na Endodontia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar as respostas de macrófagos inflamatórios murinos M1 e M2, em culturas celulares na presença de três cimentos biocerâmicos: Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França), Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), e MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil).

2.2 Objetivos específicos:

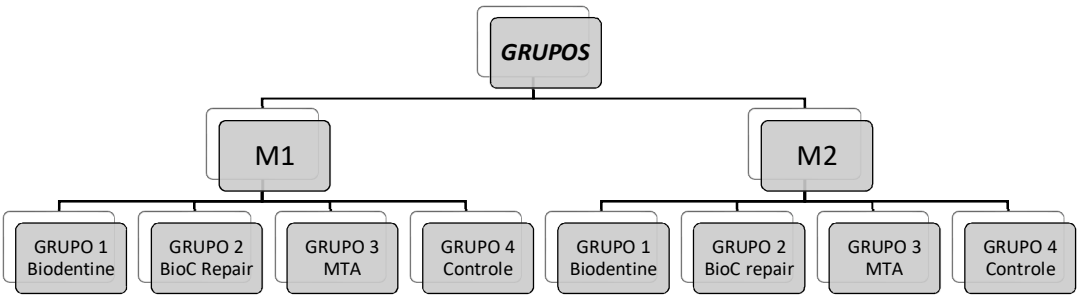
- Avaliar a viabilidade celular de macrófagos M1 e M2 cultivados na presença e ausência (controle) dos diferentes cimentos biocerâmicos;
- Avaliar a capacidade de aderência de macrófagos M1 e M2 cultivados na presença e ausência (controle) dos diferentes cimentos biocerâmicos;
- Avaliar a capacidade de fagocitose dos macrófagos M1 e M2 cultivados na presença e ausência (controle) dos diferentes cimentos biocerâmicos;
- Avaliar a produção ROS pelos macrófagos M1 e M2 cultivados na presença e ausência (controle) dos diferentes cimentos 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 ROS de dois subtipos de macrófagos, M1 e M2 na presença e ausência dos biocerâmicos. Os macrófagos inflamatórios do subtipo M1 foram obtidos de camundongos C57BL/6 e, os macrófagos inflamatórios do subtipo M2 foram obtidos de camundongos BALB/c. As culturas celulares foram mantidas na presença e na ausência dos cimentos biocerâmicos reparadores. Essa pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de ética e pesquisa em animais, (CEUA-UFMG 154/2019).

Três grupos experimentais foram constituídos de acordo com o cimento biocerâmico testado, além um grupo controle (capilares vazios), todos adicionados às culturas celulares de macrófagos M1 e M2, como se segue:

- Grupo I – tubos capilares contendo o cimento Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França).
- Grupo II – tubos capilares contendo o cimento BioC Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil);
- Grupo III – tubos capilares contendo o MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil);
- Grupo IV – tubos capilares vazios (controle).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

3.1 Animais

Foram utilizadas duas linhagens de camundongos, femeas, C57BL6 e BALB/c, 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 da mesma linhagem 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 Zymosam A, de *Saccharomyces cerevisae* (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 contagem de células fagocíticas. A relação entre o número de microrganismos utilizados/células em cultura, em cada ensaio realizado, foi previamente, padronizado em uma curva dose-resposta.

3.3 Preparo dos cimentos reparadores

Utilizaram-se três cimentos reparadores endodônticos:

- Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França), composto por silicato tricálcio; óxido de zircônio; carbonato de cálcio; cloreto de cálcio; polímero policarboxilato.
- BioC Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), cimento pronto para uso, composto por silicato de cálcio; aluminato de cálcio; óxido de cálcio; óxido de zircônio; óxido de ferro; dióxido de silício; agente de dispersão.
- MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), composto por silicato dicálcico; silicato tricálcico; aluminato tricálcio; ferroaluminato tetracálcico; óxido de bismuto.

Os cimentos que necessitaram de manipulação, como o Biodentine e o MTA, foram manipulados de acordo com as especificações de cada 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 ficasse padronizado, já que o diâmetro do tubo corresponde a 3,52 mm^2. A seguir, os tubos contendo os cimentos foram armazenados em placa de cultura de seis poços (Nunclon ^{TM}, 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

Para a obtenção de macrófagos peritoneais inflamatórios, os camundongos foram injetados intraperitonealmente, 05 dias antes o sacrifício, com 2mL de tioglicolato estéril, a 3%, contendo 1% de ágar esterilizado (Biobras S.A.®, Montes Claros, MG, Brasil). Após 05 dias, tempo necessário para instalar o processo inflamatório local com recrutamento de macrófagos, os animais foram sacrificados por meio do deslocamento cervical. Com o intuito de se conseguir o maior conteúdo possível da suspensão celular, foi injetado 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, que foi centrifugada a 350 rotações por minuto durante dez minutos a 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 Newbauer, sob microscopia ótica, observando-se que mais de 90% delas tinham 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 x 10^5 células foram cultivadas em placa de 24 poços; para os ensaios de fagocitose e produção de ROS, utilizaram-se 5 x 10^5 células/mL; e, finalmente, para a verificação de aderência celular, foram utilizadas 1x10^6 células/mL. Todas as incubações foram realizadas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2, à 37°C (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

3.5 Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade dos macrófagos inflamatórios, M1 e M2, frente ao substrato, foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Nunclon TM, Nalge Nunc International), utilizando-se dois métodos: o ensaio MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e a exclusão do Azul de Tripan.

O ensaio MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) é um método comumente utilizado para avaliar a viabilidade celular. É baseado 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). Para isso, utilizou-se placa de 96 poços (Nunclon ^{TM}). Em cada poço da placa de 24 poços adicionou-se 200 µL da suspensão celular, a uma concentração de 1 x 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 100 µL 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 100 µL 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.

O Azul de Tripan é um corante que é negativamente carregado e não interage com a membrana célular, internalizando no citoplasma apenas se a membrana estiver danificada. Assim células vivas, ou tecidos com membranas celulares intactas, não

são corados. Para a realização desse ensaio, utilizaram-se placas de 24 poços (Nunclon ™), em cada poço, adicionou-se os tubos capilares e 1 mL da suspensão celular contendo 1 x 10^5 células. A seguir, as placas foram incubadas, respeitando-se os tempos determinados e, a análise da viabilidade foi realizada em microscópio invertido, após o acréscimo de 100µL de solução de azul de tripan (Sigma). Foram contadas células viáveis e não viáveis num total de 200 células e os resultados foram expressos em porcentagem (BRAGA *et al.*, 2015; DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003).

3.6 Aderência Celular

A aderência de macrófagos inflamatórios ao substrato foi realizada em tubos de polipropileno estéreis (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra). Foram adicionadas 1 mL de suspensões celulares contendo 1x10^6 células/mL e os capilares contendo ou não os cimentos bioceramicos. 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 homogeinização. Em seguida, alíquotas de 20µL de cada amostra foram removidas, e acondicionadas em câmaras de Newbauer. Estas foram armazenadas no interior de placas de petri umidificadas e, novamente incubadas a 37°C, por 18 horas (lee, Monsef e Torabinejad, 1993). 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, M1 e M2, 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 ressuspendida em PBS 1X, obtendo-se uma concentração de 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, estéreis (GlassTécnica, GlassTécnica Importação e Comércio de Vidros, São Paulo, SP, Brasil), foram colocadas em poços de uma placa de cultura de 24 poços (NunclonTM;, Nalge Nunc International). Sobre essas lamínulas foram acrescidos 200 µL da suspensão celular contendo $5X10^5$ 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, foi acrescentado aos poços 1 mL de RPMI 1640, sem fenol vermelho, a 37°C e 10 µL 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 1 mL de ácido tânico, a 1% (Dinâmica Química Conteporânea Ltda, São Paulo, Brasil), diluído em água destilada, durante 10 minutos. Este tratamento permiti 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 coradas, de acordo com a recomendação do fabricante (descrito abaixo), 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 com 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 100 macrófagos por lamínula. Determinou-se o número total de macrófagos com leveduras fagocitadas, bem como o número de leveduras fagocitadas por cada macrófago, determinando-se as respectivas porcentagens.

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 300 µL 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 mensuração da produção de radicais livres de oxigênio pelos macrófagos M1 e M2, quando na presença ou ausência dos biocerâmicos, foi utilizado Zymosan A de *S. cerevisae*. O Zymosan A foi diluído em PBS e, em seguida, realizou-se a contagem do número de partículas em câmara de Newbauer. Diluiu-se em PBS para se atingir uma concentração de 10^9 partículas/mL. Essa solução foi armazenada até o momento do experimento, sob-refrigeração. A estimulação celular se deu a uma proporção de 10 partículas de Zymosan A para cada célula na cultura (TRUSH *et al.*,1978).

Utilizou-se culturas celulares contendo $5X10^5$ células/mL em placas opacas de 96 poços. Em metade de cada amostra foi adicionado 50 µL de Zimosan A, na concentração de 10^9 partículas/mL, 130 µL de suspensão celular e 20 µL de luminol, enquanto nos poços sem estímulo, foram colocados 180 µL de suspensão celular e 20 µL de luminol. A solução de estoque do luminol foi preparada dissolvendo-se 1,77mg em 1mL de dimetil sulfóxido (DMSO). A placa foi levada ao Lumicount TM (Packard Bioscience Company, Inc, Downers Grove, IL, EUA) para leitura.

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, respectivamente. Os resultados foram considerados significativos quando $p<0,05$.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Tipo de artigo: Artigo científico

Título: Influência dos cimentos biocerâmicos biodentine, MTA e bio-c repair nas respostas de macrófagos m1 e m2 de murinos.

Autores: Marcela Martins Costa[1], Layara Cristine Tomaz Tavares[2], Francielen Oliveira Fonseca[3], Betânia de Lourdes Canal Vasconcellos[4], Leda Quercia Vieira[5], Warley Luciano Faria Tavares[6], Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho[7].

Afiliações e graus acadêmicos:

1. BDS Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. (celamartinsc@gmail.com)
2. MS - Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. (layara_tavares@hotmail.com)
3. BDS student - Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. (oliveiraf.fran@gmail.com)
4. BDS student - Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. (betaniavasconcellos7@gmail.com)
5. PhD- Institute of Health Sciences- Universidade Federal de Minas Gerais
6. DDS, MS, PhD - Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil (warleyt@hotmail.com)
7. DDS, MS, PhD - Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil (sobrinho.bhz@gmail.com)

Autor correspondente: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antonio Carlos, 6627
31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil
E-mail: sobrinho.bhz@gmail.com
Phone: +55 31 3409-2440

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio do Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores negam qualquer conflito de interesses relacionado a este estudo.

INTRODUÇÃO

O agregado de trióxido mineral (MTA), é um material bioativo, hidrofílico (Koche, 2012) amplamente utilizado como material reparador, em tratamentos como pulpotomia, capeamento pulpar, reabsorções, perfurações, apicificação, regeneração pulpar e retro-obturação em cirurgias parendodônticas (Torabinejad & Chivian, 1999, Bogen & Kuttler, 2009). Embora apresente excelente biocompatibilidade (Rezende et al. 2005,2007; Braga et al. 2015), suas propriedades físico químicas como escoamento, consistência, longo tempo de presa e trabalho e descoloração da estrutura dentária, dificultam seu uso (Rezende *et al.*, 2007; Scarparo *et al.*, 2009). Para superar essas desvantagens, novos biocerâmicos reparadores à base de silicatos estão sendo desenvolvidos apresentando propriedades físico-químicas melhoradas (Darvell & wu, 2011; Ma *et al*., 2011; Vallés *et al*., 2013; Camilleri *et al*., 2015a), como o Cimento Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França), e o cimento Bio-C Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil).

O Biodentine é um cimento de silicato tricálcico, que apresenta pó e líquido pré-dosados. O carbonato de cálcio do pó junto com o cloreto de cálcio presente no líquido promovem, de maneira mais rápida, a liberação de cálcio, favorecendo o processo de reparo (Camilleri, 2013). Apresenta ainda resultados satisfatórios em relação à citotoxicidade, atividade antimicrobiana, genotoxicidade e características físicas, além de induzir a diferenciação de células semelhantes à odontoblastos (Han & Okiji, 2013; Nowicka et al., 2013). Outro material que merece destaque é o Bio-C Repair por ser um produto pronto para uso em consistência putty e armazenado em uma seringa rosqueável, eliminando assim a necessidade de manipulação (Benetti, 2019). Quando avaliados frente a fibloblastos de ratos tal material demostrou citocompatibilidade, biocompatibilidade e biomineralização semelhante ao MTA (Benetti, 2019).

Devido ao fato destes cimentos apresentarem íntimo contato com os tecidos perirradiculares durante sua utilização, é essencial que não interfiram de forma deletéria na resposta imunológica do hospedeiro, especificamente, na atividade dos macrófagos, por serem uma das primeiras células a entrarem em contato com antígenos nos tecidos (Stern *et al*., 1981; Kawashima *et al*., 1996; Rezende *et al*., 2005).

A ativação dos macrófagos ocorre através da via clássica e alternativa. A primeira é mediada por estímulos como interferon gama (IFN-γ), fator de necrose

tumoral alfa (TNF-α), receptores do tipo Toll (TLR) e lipopolissacáridos (LPS) (Solinas *et al*., 2009; Geissmann *et al*., 2010), e apresenta grande capacidade de fagocitar, aderir, e produzir concentrações elevadas de IL-12 e IL-23, além de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), estes últimos responsáveis por promover a eliminação de patógenos. Por apresentar um direcionamento de respostas pelos linfócitos Th1, são denominados macrófagos M1(Mills *et al*., 2000; Bastos *et al*., 2002; Mosser 2003; Rezende *et al*., 2005). Em contrapartida os macrófagos M2 são ativados pela via alternativa provocando alterações nas vias metabólicas, como no metabolismo da arginina, que converge ornitina e poliamina em vez de citrulina e NO. É caracterizado ainda por produzir altas concentrações citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β e baixa de NO, ROS. (Bastos *et al*. 2002, Rezende *et al*., 2007; Solinas *et al*., 2009).

Assim, os macrófagos podem ser classificados em subtipos M1 e M2 baseados em sua relação de receptores, função e produção de citocinas (Metzger 2000; Mosser 2003; Rezende *et al.*, 2005). Diante do papel relevante dos macrófagos na resposta imune e em seu direcionamento, este estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade celular, a aderência, a capacidade fagocítica e a produção de ROS pelos macrófagos dos tipos M1 e M2 murinos, após contato com o, Biodentine e Bio-C Repair em comparação com o MTA. A hipótese nula foi que esses materiais não apresentem diferenças na viabilidade, aderência, fagocitose e produção de ROS quando comparados ao MTA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Camundongos fêmeas C57BL/6 e BALB/c de 4 a 8 semanas foram fornecidos pelo (CEBIO-UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil e mantidos em biotério com barreiras, em gaiolas apropriadas com controle de temperatura, luminosidade, contendo ração e da água ad libitum. O protocolo de pesquisa foi autorizado pelo comitê de ética e pesquisa em animais, (CEUA-UFMG 154/2019).

Macrófagos

Os macrófagos inflamatórios peritoneais foram obtidos após 5 dias da injeção de 02 mL de caldo tioglicolato estéril a 3% contendo 1% de ágar esterilizado (Biobras S.A.®, Montes Claros, MG, Brasil). Os animais foram sacrificados e 10 mL de solução tampão estéril foram injetados na cavidade peritoneal com auxílio de uma seringa e o maior conteúdo possível foi aspirado. As células foram centrifugadas a 350 g por 10 min, a 4ºC, e após descartar o sobrenadante, foram ressuspendidas e contadas sob microscopia óptica em câmara de Neubauer. Mais de 90% delas tinham características morfológicas de macrófagos (Braga et al. 2014). A concentração final foi ajustada de acordo com cada ensaio; viabilidade por azul de tripan 1 x 10^5, viabilidade por MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e aderência 1 x 10^6, fagocitose e ROS 5 x 10^5. Os cimentos Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França), BioC Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) e MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) foram inseridos nas extremidades dos capilares estéreis e armazenados em placa de 6 poços. Posteriormente, os mesmos foram colocados em contato com a suspensão celular. Capilares vazios foram utilizados como grupo controle negativo (De Oliveira Mendes *et al*. 2003).

Preparo dos cimentos

O Biodentine e o MTA, foram manipulados em condições de esterilidade, sob fluxo laminar. Ainda sob o fluxo, 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, para que o contato dos cimentos com a suspensão celular ficasse padronizado. A seguir, os tubos contendo os cimentos foram armazenados em placa de cultura de seis poços (Nunclon TM, Nalge Nunc

International, Naperville,IL, EUA). O grupo controle foi representado pelos tubos capilares vazios (De Oliveira Mendes et al., 2003).

Composição dos cimentos utilizados:

- Biodentine (Septodont, Saint-Maur-desFossés, França), composto por silicato tricálcio; óxido de zircônio; carbonato de cálcio; cloreto de cálcio; polímero policarboxilato.
- BioC Repair (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), cimento pronto para uso, composto por silicato de cálcio; aluminato de cálcio; óxido de cálcio; óxido de zircônio; óxido de ferro; dióxido de silício; agente de dispersão.
- MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), composto por silicato dicálcico; silicato tricálcico; aluminato tricálcio; ferroaluminato tetracálcico; óxido de bismuto.

Viabilidade

A viabilidade celular foi realizada em triplicata nos tempos de 24, 48 e 72 horas, através dos métodos por MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e exclusão do Azul de Tripan. O ensaio MTT utilizou placa de 96 poços (Nunclon TM) contendo os capilares e 200 µL da suspensão celular. Após a incubação nos tempos já determinados, os capilares foram removidos e os poços lavados com PBS 1X. Em seguida adicionou-se a solução de MTT e a leitura foi realizada em leitor de microscopia (Bio-Rad, 2550, Hercules, EUA) (Braga *et al*. 2014). No método por Azul de Tripan foram utilizadas placas de 24 poços (Nunclon TM) contendo os tubos capilares e 1 ml da suspensão celular. As placas foram incubadas e a leitura realizada em microscópio invertido, após o acréscimo de 100µL de solução de azul de tripan (Sigma) em cada poço. Foram contadas células viáveis e não viáveis e os resultados foram expressos em porcentagem (De Oliveira Mendes *et al*., 2003; Braga *et al*., 2015).

Aderência

O ensaio sobre a aderência foi realizado por meio da adição de 1 mL da suspensão celular com os capilares em tubos de polipropileno estéreis (Corning, Cambridge, MA, Inglaterra). Após 2 horas incubados foram homogeneizados pelo vortex, e alíquotas de 20µL de cada amostra foram colocadas em câmaras de

Newbauer, para armazenamento em placas de petri umidificadas. Depois de nova incubação por 18 horas, foi realizada a contagem dos macrófagos aderentes ou não, pela microscopia óptica e o resultado foi expresso em porcentagem (Lee, Monsef e Torabinejad, 1993).

Fagocitose

No estudo da fagocitose lamínulas de vidro redondas estéreis (GlassTécnica, GlassTécnica Importação e Comércio de Vidros, São Paulo, SP, Brasil) foram colocadas em placas de 24 poços (NunclonTM;, Nalge Nunc International). Após adicionar 200 µL da suspensão celular, foram levadas para estufa durante 2 horas. As células foram lavadas e acrescentou-se aos poços 1 mL de RPMI 1640 sem fenol vermelho, 10 µL da suspensão de *S. boulardii* na concentração de 107 células/poço e os capilares. Esta levedura foi escolhida devido ao seu tamanho, que facilitou a visualização após fagocitose pelos macrófagos, e, portanto, permitiu maior precisão dos dados (Rezende et al. 2007). Foi realizada nova incubação por 1 hora, e em seguida os poços foram lavados e cobertos com 1 mL de ácido tânico a 1% (Dinâmica Química Conteporânea Ltda, São Paulo, Brasil), durante 10 minutos. Posteriormente as lamínulas foram coradas com panótico rápido (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Plnhais, PR, Brasil). Após a coloração e secagem, a leitura foi realizada em microscopia óptica, em um aumento de 100X, sob imersão em óleo (Giaimis *et al*.,1992). A leitura do número total de macrófagos com leveduras fagocitadas e o número de leveduras fagocitadas por cada macrófago foram contadas e determinadas sua porcentagem.

Produção de ROS

Para a mensuração da produção de ROS foi utilizado o Zymosan A de *S. cerevisae* na concentração de 10^9 partículas/mL, armazenado sob refrigeração até o momento do ensaio. Foi utilizada placa de 96 poços contendo os capilares, 50 µL de Zimosan A, 130 µL de suspensão celular e 20 µL de luminol, enquanto nos poços sem estímulo, foram colocados os capilares, 180 µL de suspensão celular e 20 µL de luminol. Em seguida, a leitura da placa foi levada ao Lumicount TM (Packard Bioscience Company, Inc, Downers Grove, IL, EUA).

Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do programa Graphpad Prism 8.0.1, no qual foi utilizado o teste de variância ANOVA (comparações múltiplas), sendo as análises propostas consideradas significativas quando p <0,05.

RESULTADOS

Viabilidade celular

A viabilidade pelo ensaio de MTT é demostrada através da figura 1 (a, b). A viabilidade celular média para esse ensaio foi maior que 85% em todas as culturas de macrófagos. O Biodentine induziu menor viabilidade no tempo de 24h apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle, tanto para M1(a) quando M2(b) (p <0,05). Não houve diferença nas porcentagens de células vivas nos tempos de 24, 48, 72 horas entre os grupos de cimentos analisados frente a células M1 e M2.

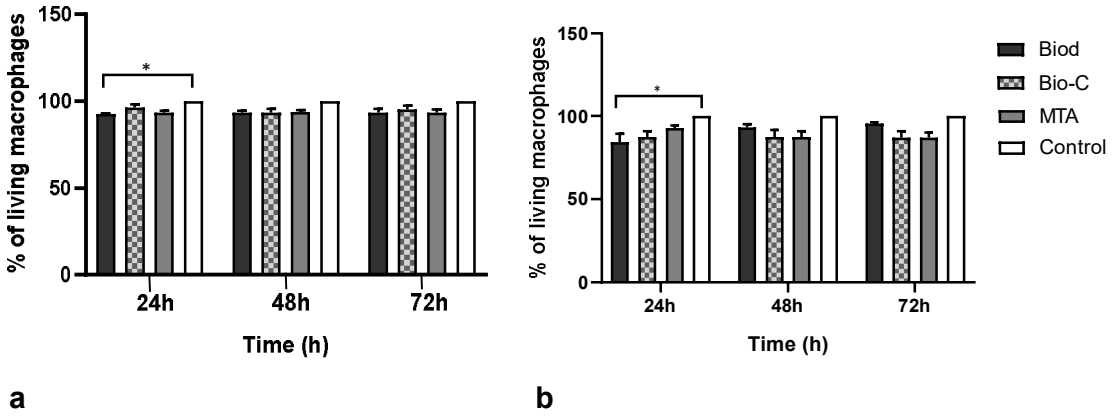


Figura 1: Porcentagem de macrófagos M1 (a) e M2 (b) após o ensaio de viabilidade celular MTT com capilares contendo os biocerâmicos e grupo controle, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. (*) indica diferença estatística entre os grupos (p <0,05).

A viabilidade celular utilizando a técnica de exclusão de azul de tripan é demonstrada na figura 2 (a, b). A viabilidade celular média foi maior que 96% em todas as culturas de macrófagos M1 e M2. Para os macrófagos M1, foi observado que, o Biodentine em 24h, induziu menor viabilidade em relação ao controle (p <0,05); em 72h todas as células permaneceram com altas porcentagem de células vivas, não havendo diferença estatística entre os grupos de cimento. Para os macrófagos M2 no

tempo de 24h houve menor viabilidade do biodentine em relação ao grupo controle (p <0,05).

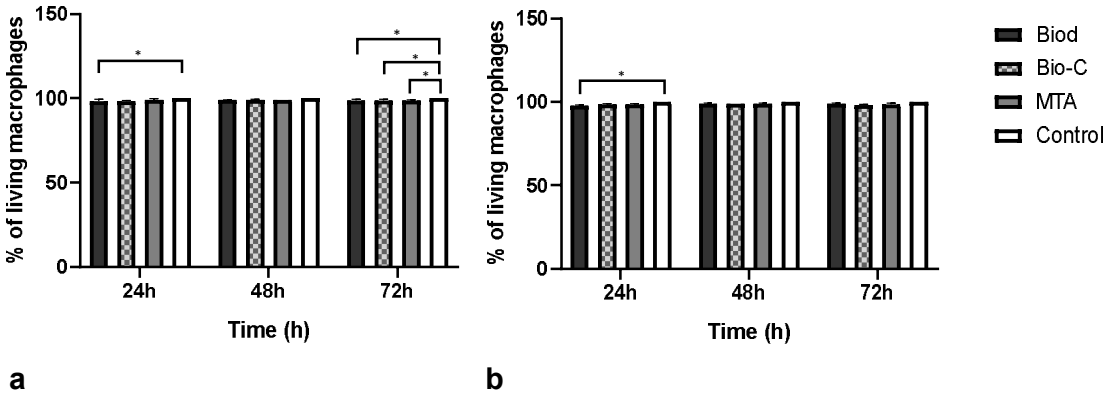


Figura 2: Porcentagem de macrófagos M1 (a) e M2 (b) após o ensaio de viabilidade celular com o método de exclusão do azul de tripan, após contato direto com os biocerâmicos e grupo controle, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. (*) indica diferença estatística entre os grupos (p <0,05).

Ensaio de Aderência Celular

O resultado da aderência celular foi semelhante entre os macrófagos M1 e M2. Não houve diferença estatística significante na porcentagem de células aderidas para os dois tipos de macrófagos nos grupos avaliados. (Figura 3).

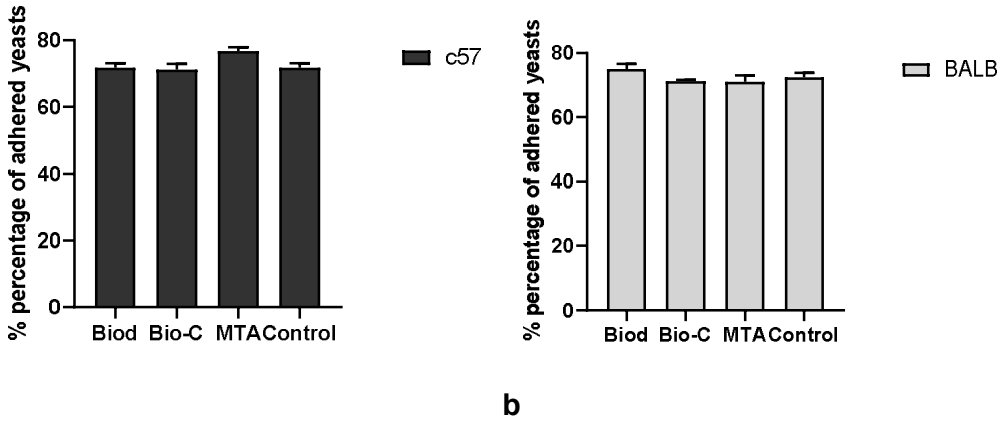


Figura 3: Porcentagem da aderência celular em M1 (a) e de M2 (b) com capilares contendo ou não os biocerâmicos (p <0,05).

Ensaio de Fagocitose

A análise da porcentagem de macrófagos com leveduras fagocitadas está representada pela figura 4 (a,b). Não houve diferença estátistica dentro dos grupos M1 (a) e M2(b). Quando os grupos M1 e M2 foram comparados entre si, os macrófagos M1 apresentaram capacidade fagocítica estatisticamente maior que os macrófagos M2 ($p<0,05$). O número médio de leveduras fagocitadas por cada macrófago está representado na figura 3(c,d). Não houve diferença estatística entre os cimentos nos grupos M1(c) e M2(d), por sua vez, o número médio de levedura fagocitadas por M1 foi superior a M2.

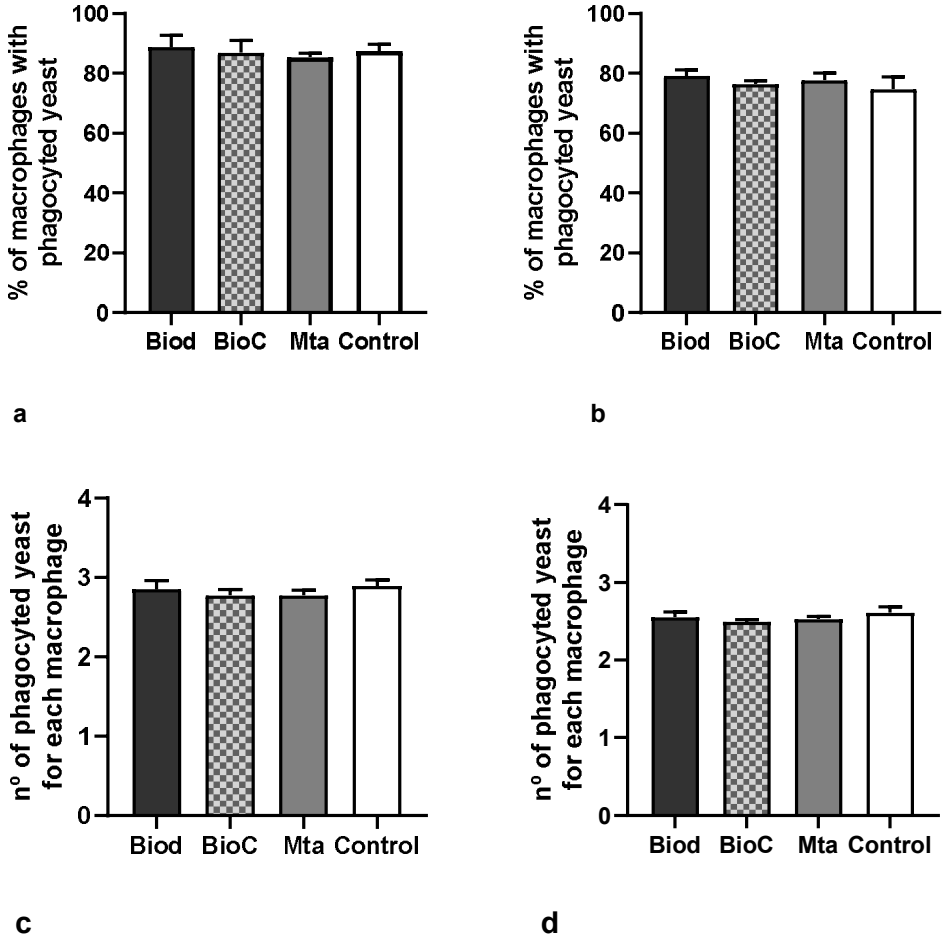


Figura 4: Porcentagem de macrófagos com levedura fagocitada M1(a) e M2(b). Não houve diferença estatística entre os cimentos nos grupos M1 e M2, por sua vez, quando comparados entre si, os macrófagos M1 apresentaram capacidade fagocítica estatisticamente maior que os macrófagos M2 ($p<0,05$). Número médio de levedura fagocitada por cada macrófago M1(c) e M2(d). Não houve diferença estatística entre os cimentos nos grupos M1 (c) e M2(d), por sua vez, o número médio de levedura fagocitadas por M1 foi superior a M2 ($p<0,05$).

Produção de ROS

A produção de ROS é mostrada na figura 5. Em geral, tanto os macrófagos M1(a) quanto M2(b) apresentaram níveis de ROS superiores quando estimulados pelo zymosan. Os macrófagos M1 produziram mais ROS do que M2, na presença do estímulo ($p< 0,05$). Em M1 a adição de zymosan induziu maior produção de ROS pelo Biodentine em relação ao Bio-C Repair, MTA e controle ($p< 0,05$).

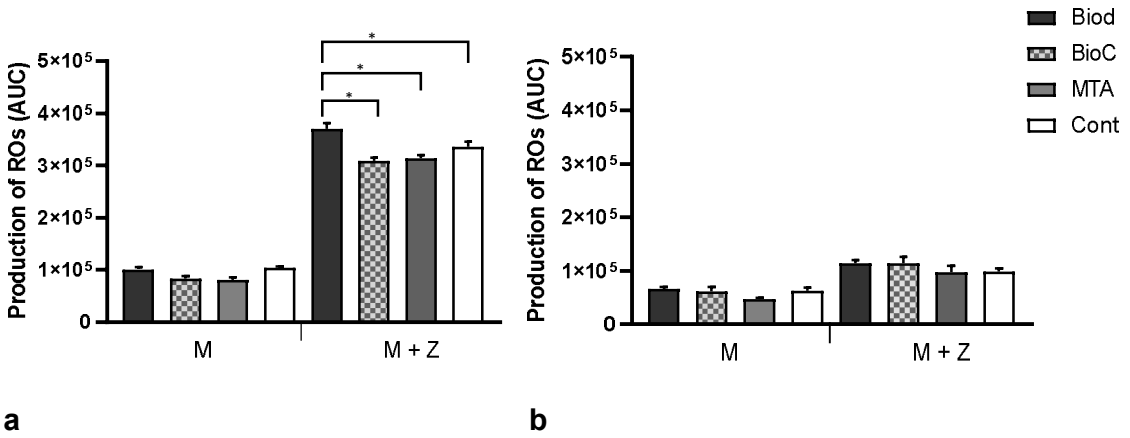


Figura 5: Média da luminescência expressa pela área sob a curva de produção de ROS pelos macrófagos M1 (a) e M2 (b) após contato com os biocerâmicos e o grupo controle. M indica culturas de macrófagos e M + Z indica culturas de macrófagos na presença do Zimosan A. (*) indica diferença estatística entre os grupos ($p <0,05$).

DISCUSSÃO

O macrófago é uma importante célula que participa da imunidade inata e condiciona a adaptativa, através da fagocitose de partículas estranhas ao hospedeiro, da sua função de apresentação de antígenos, da sua ação antimicrobiana (Elomaa *et al*., 1998) e da sua capacidade de produzir mediadores que interferem na função imunológica (De la Torre *et al*., 2008). Desde a descoberta da sua finalidade na segunda metade do século XIX, o papel destas células tem despertado interesse (Metchnikoff, 1908), já que são importantes para assegurar um normal funcionamento do hospedeiro através do controle dos processos inflamatórios (podendo promovê-los ou inibi-los), do desenvolvimento de tecidos e da sua cicatrização, bem como da modulação óssea (De la Torre *et al*., 2008; Epelman *et al*., 2014).

Os macrófagos podem ser polarizados em células do tipo M1 ou M2, dependendo do estímulo recebido, caso ocorra pela via clássica ou alternativa (Mosser e Edwards, 2008; Geissmann *et al*., 2010). Os macrófagos M1 desempenham um papel preponderante na proteção a agentes patogénicos intracelulares, em virtude da sua grande atividade citotóxica e da resposta imune que desencadeiam (Solinas *et al*., 2009; Geissmann *et al*., 2010). A ativação alternativa, que origina o macrófago M2, apresenta um papel anti-inflamatório, está envolvida nos processos de cicatrização e é responsável por promover a limpeza de possíveis detritos (Mills *et al*., 2000; Bastos *et al*., 2002; De Oliveira Mendes *et al*., 2003; Rezende *et al*., 2007).

Ao longo dos anos, estudos que tratam da biocompatibilidade de cimentos endodônticos, têm demonstrado interesse nos efeitos adversos que eles podem desencadear nas defesas imunológicas inatas e adquiridas do organismo (De Oliveira Mendes *et al*., 2003; Rezende *et al*. 2005, Rezende *et al*., 2007, Braga *et al*., 2014; Braga *et al*., 2015; Escobar-García, 2016; Benetti, 2019). O presente estudo avaliou o efeito de três cimentos biocerâmicos endodônticos utilizados para reparação dos sistemas de canais radiculares, na atividade de macrófagos *in vitro*, uma vez que estes são normalmente utilizados em íntimo contato com os tecidos perirradiculares.

O primeiro passo foi analisar a viabilidade celular pelo ensaio de MTT na presença desses cimentos. O biodentine apesar de apresentar um percentual acima de 85% de viabilidade celular no período de 24h, foi estatisticamente menos compatível em relação ao controle. Por outro lado, nos períodos posteriores (48 e 72h) houve um aumento gradual de suas células vivas. Tal fato pode ser atribuído aos constituintes desse material (Escobar-García, 2016). De acordo com resultados encontrados em estudos prévios utilizando monócitos (Khedmat *et al*., 2014) e fibroblastos (Daltoe *et al*., 2016), não houveram diferenças significativas, em todos os tempos propostos, entre o MTA e o Biodentine.

Em relação à viabilidade celular, utilizando o método do azul de tripan, pode-se perceber que em 24h e 48h o MTA não interferiu na viabilidade dos macrófagos, consistente com os resultados obtidos em outros estudos (Rezende *et al*., 2007, Braga *et al*., 2015). O biodentine novamente se mostrou menos biocompatível para macrófagos M1 e M2 no período de 24h em relação ao controle, apesar de sua porcentagem de células vivas ter se mostrado acima de 90%. Além disso, o tempo de incubação, como já citado em outros estudos, pode influenciar a porcentagem de

macrófagos vivos (Rezende *et al*., 2007), uma vez que, em 72h houve diferença estatística de todos os grupos com o controle para macrófagos M1. Apesar da persistência e do elevado número de células vivas após 72h, o início da escassez de nutrientes no meio pode ter influenciado na diminuição da viabilidade dessas células. Os materiais biocerâmicos contendo óxido de zircônio geram menos inflamação em comparação aos que contêm óxido de bismuto (Silva, 2017), entretanto ao se comparar, nesse estudo, o Bio-C repair com MTA, representantes dessas categorias respectivamente, não houve diferença significativa entre eles tanto em relação às células M1 quanto M2, estando este resultado em consonância com os resultados obtidos em um recente estudo (Benetti, 2019).

É importante observar que em nenhum momento foi encontrado diferenças entre as viabilidades dos macrófagos M1 e M2 nos grupos de cimentos, e que a elevada porcentagem de células vivas durante todo o ensaio, confirmam o caráter biocompatível e não citotóxico que esses materiais apresentam.

Nesse estudo nenhum dos cimentos utilizados interferiu na adesão celular, o que demonstrou que eles não prejudicam as respostas do sistema imunológico, como demostrado previamente (Unanue, 1987; Fujiwara & Kobayashi, 2005). Resultados semelhantes foram observados em estudos utilizando o MTA (Rezende *et al*., 2007; Braga *et al*., 2015; Ghilotti *et al*., 2020).

Após a adesão dos macrógafos ao substrato, dá-se início o processo de fagocitose, que é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata, no qual células mortas e partículas estranhas são englobadas e posteriormente ingeridas (Pacheco, 2012). Durante essa fase é desencadeada a degradação do patogéno para posterior apresentação dos seus antígenos, associados ao MHC, conduzindo ao desenvolvimento da imunidade adquirida (Strauss, 2010). Assim, foi investigada a resposta de macrófagos peritoneais *in vitro* ao ingerir a levedura *Saccharomyces boulardii*, após contato com os cimentos biocerâmicos. Essa levedura foi utilizada pelo fato de apresentar tamanho favorável, o que facilitou a contagem e permitiu maior precisão (Rezende, 2007; Braga, 2015). Nenhum cimento testado inibiu a capacidade fagocitária dos macrófagos para ambos os subtipos demonstrando características biocompatíveis. O subtipo M1 mostrou uma capacidade em fagocitar a *S. boulardii* estatisticamente maior que M2 em todos os grupos testados, o que foi de acordo com resultados anteriores que utilizaram materiais diferentes à base de óxido de zinco-

eugenol (De Oliveira Mendes *et al*., 2003) e MTA (Braga, 2015), bem como o número médio de levedura fagocitada por cada macrófago foi maior em M1. Em contrapartida, estudos anteriores usando MTA, mostrou um número médio de leveduras fagocitadas, maior pelas células M2 quando comparado àa células M1 (Rezende *et al*., 2007).

A fagocitose, consequentemente, leva à ativação dos macrófagos que induz a estimulação de uma série de processos bioquímicos e metabólicos com liberação de citocinas pró-inflamatórias e produção de ROS, contribuindo assim para a degradação microbiana (Schindl *et al*., 2006). Nesse estudo; os macrófagos M1 produziram maiores concentrações de ROS que M2 estando de acordo com relatos anteriores (Mosser 2003; Rezende *et al*., 2007). Em contrapartida, Braga *et al*. (2014) relataram a maior produção de ROS pelos macrófagos M2. Além de ser o subproduto da respiração celular, os ROS também estão envolvidos em uma ampla variedade de processos celulares, como sobrevivência e crescimento celular, proliferação e diferenciação, senescência celular e apoptose, além de participarem de várias vias de sinalização que não estão diretamente relacionadas a atividade microbicida, como por exemplo, ser mediador da expressão de RANKL, demonstrando que os ROS possam estar envolvidos no processo de reabsorção óssea perirradicular (Yang et al., 2013). No presente estudo os mcrófagos, quando estimulados, induziram níveis de ROS significativamente mais altos pelo Biodentine em relação aos outros cimentos e ao controle, quando em contato com as células M1. Tal resultado é esperado, uma vez que uma indução de ROS significativa está relacionada à uma maior eliminação de patógenos (Paiva, 2014). Não houve diferença estatística na produção de ROS por macrófagos M2, na presença ou ausência do estímulo, fato também observado, em estudos anteriores em relação ao MTA (Rezende et al., 2007).

CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que os cimentos biocerâmicos reparadores Biodentine, Bio-C Repair não afetaram as atividades efetoras de macrófagos M1 e M2 quando comparados ao MTA. Os cimentos testados não interferiram na viabilidade e adesão celular, no processo de fagocitose, e na produção de ROS.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores também desejam agradecer ao programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Somos gratos a Dra. LQ Vieira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG) por fornecer espaço e equipamento laboratorial para a execução dos experimentos neste trabalho. Ângelus (Londrina, PR, Brasil) gentilmente forneceu reparo no MTA e no Bio-C.

CONFLITO DE INTERESSE:

Os autores negam qualquer conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

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

BENETTI, F. *et al*. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. **Brazilian dental journal**, v. 30, n. 4, p. 325-332, 2019.

BOGEN, G.; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **Journal of endodontics**, v. 35, n. 6, p. 777-790, 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. **International endodontic journal**, v. 47, n. 10, p. 909-919, 2014.

BRAGA, J. *et al*. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. **Dental Traumatology**, v. 31, n. 5, p. 390-395, 2015.

CAMILLERI, J.; SORRENTINO, F.; DAMIDOT, D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. **Dental Materials**, v. 29, n. 5, p. 580-593, 2013.

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

DALTOÉ, M. O. *et al*. Expression of mineralization markers during pulp response to biodentine and mineral trioxide aggregate. **Journal of endodontics**, v. 42, n. 4, p. 596-603, 2016.

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 LA TORRE, E. *et al*. Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 2, p. 82-89, 2008.

DE OLIVEIRA MENDES, ST. *et al*. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 2, p. 95-99, 2003.

ELOMAA, O. *et al*. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 8, p. 4530-4538, 1998.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 2014.

ESCOBAR-GARCÍA, DM. *et al*. Cytotoxicity and initial biocompatibility of endodontic biomaterials (MTA and Biodentine™) used as root-end filling materials. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GEISSMANN, F. *et al*. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GHILOTTI, J. *et al*. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. **Materials**, v. 13, n. 9, p. 2189, 2020.

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.

HAN, L.; OKIJI, T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. **International endodontic journal**, v. 46, n. 9, p. 808-814, 2013.

KAWASHIMA, N. *et al*. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **Journal of endodontics**, v. 22, n. 6, p. 311-316, 1996.

KHEDMAT, S. *et al*. In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. **Restorative dentistry & endodontics**, v. 39, n. 3, p. 149-154, 2014.

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

MA, J. *et al*. Biocompatibility of two novel root repair materials. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 6, p. 793-798, 2011.

MECHNIKOV, I. On the present state of the question of immunity in infectious diseases. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine**, p. 1901-1921, 1908.

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. **The Journal of immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

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

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

NOWICKA, A. *et al*. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 6, p. 743-747, 2013.

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

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens?. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000-1037, 2014.

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

REZENDE, T. M. B. *et al*. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **International endodontic journal**, v. 40, n. 8, p. 603-611, 2007.

SCARPARO, R. K.; GRECCA, F. S.; FACHIN, E. V. Freitas. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide–eugenol endodontic sealers. **Journal of endodontics**, v. 35, n. 2, p. 229-232, 2009.

SILVA, G. F. *et al*. Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. **International endodontic journal**, v. 50, p. e95-e108, 2017.

SOLINAS, G. *et al*. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 5, p. 1065-1073, 2009.

STERN, M. H. *et al*. Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. **Journal of endodontics**, v. 7, n. 3, p. 117-122, 1981.

STRAUSS, R. R. Association of Some Metabolic Activities of Leukocytes with the Immune Response. In: **Macrophages and Lymphocytes**. Springer, Boston, MA, 1980. p. 3-19.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **Journal of endodontics**, v. 25, n. 3, p. 197-205, 1999.

UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v. 236, n. 4801, p. 551-557, 1987.

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.

YANG, Y. *et al*. Reactive oxygen species in the immune system. **International reviews of immunology**, v. 32, n. 3, p. 249-270, 2013.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou avaliar as respostas dos macrófagos inflamatórios, M1 e M2, *in vitro*, após contato com três cimentos biocerâmicos; o Biodentine, o Bio-C Repair, e o MTA. Observou-se que estes cimentos não interferiram na viabilidade dos macrófagos, na aderência, atividade fogocítica e produção de ROS, quando estimulados ou não. Ao se comparar os subtipos de macrófagos, viu-se que os macrófagos M1 apresentaram capacidade fagocítica e número médio de levedura fagocitadas por macrófago superior aos macrófagos M2. Quanto a produção de ROS, os macrófagos M1 produziram maiores níveis que os M2 quando na presença de estímulo.

Conclui-se que os cimentos biocerâmicos reparadores Biodentine, Bio-C Repair não afetaram as atividades efetoras de macrófagos M1 e M2 quando comparados ao MTA, bem como não interferiram na viabilidade e adesão celular, no processo de fagocitose, e na produção de ROS.

REFERÊNCIAS

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

BEATRICE, L. C. S. *et al*. Materiais retrobturadores utilizados na cirurgia paraendodôntica. **Odontol. clín. -cient**, v. 8, n. 4, 2009.

BENETTI, F. *et al*. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. **Brazilian dental journal**, v. 30, n. 4, p. 325-332, 2019.

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. **International endodontic journal**, v. 45, n. 5, p. 419-428, 2012.

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, n. 5, p. 390-395, 2015.

CANDEIRO, G. T. M. *et al*. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *International endodontic journal*, v. 49, n. 9, p. 858-864, 2016.

CAMILLERI, J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. **Endodontic Topics**, v. 32, n. 1, p. 31-46, 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. 95-99, 2003.

ESCOBAR-GARCÍA, D. M. *et al*. Cytotoxicity and initial biocompatibility of endodontic biomaterials (MTA and Biodentine™) used as root-end filling materials. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

GEISSMANN, F. *et al*. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

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.

HAN, L.; OKIJI, T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. **International endodontic journal**, v. 46, n. 9, p. 808-814, 2013.

HENRIQUES, LC. F. *et al*. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 12, p. 1659-1662, 2011.

KAWASHIMA, N. *et al*. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **Journal of endodontics**, v. 22, n. 6, p. 311-316, 1996.

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

MA, J. *et al*. Biocompatibility of two novel root repair materials. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 6, p. 793-798, 2011.

MANTOVANI, A. *et al*. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-555, 2002.

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. **The Journal of immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

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

NOWICKA, A. *et al*. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 6, p. 743-747, 2013.

OBEID, E. *et al*. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression. **International journal of oncology**, v. 43, n. 1, p. 5-12, 2013.

ORECCHIONI, M. *et al*. Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) versus classically and M2 (LPS-) versus alternatively activated macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1084, 2019.

PRATI, C.; GANDOLFI, MG.. Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. **Dental materials**, v. 31, n. 4, p. 351-370, 2015.

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

REZENDE, T. M. B. *et al*. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **International endodontic journal**, v. 40, n. 8, p. 603-611, 2007.

SOLINAS, G. *et al*. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 5, p. 1065-1073, 2009.

TABASSUM, S.; KHAN, F. R. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. **European journal of dentistry**, v. 10, n. 01, p. 144-147, 2016.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T. F.; FORD, TR. P. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **Journal of endodontics**, v. 19, n. 12, p. 591-595, 1993.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **Journal of endodontics**, v. 25, n. 3, p. 197-205, 1999.

TRUSH, M. A.; WILSON, M. E.; VAN DYKE, K. [39] The generation of chemiluminescence (CL) by phagocytic cells. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, 1978. p. 462-494.

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.