

UNESP – Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES

Avaliação in vitro da biocompatibilidade de resinas acrílicas para base de próteses e materiais reembasadores resilientes

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para o título de doutor em Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2013

Chaves, Carolina de Andrade Lima

Avaliação in vitro da biocompatibilidade de resinas acrílicas para base de próteses e materiais reembasadores resilientes / Carolina de Andrade Lima Chaves.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

177 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Machado

1. Citotoxicidade imunológica 2. Reembasadores 3. Dentaduras
4. Teste de materiais I. Título

CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES

**Avaliação in vitro da biocompatibilidade de resinas acrílicas para base de próteses e
materiais reembasadores resilientes**

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de doutor

Presidente e Orientador: Prof. Dra. Ana Lúcia Machado

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Carolina Pero Vizoto

3º Examinador: Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho

4º Examinador: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

5º Examinador: Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia

Araraquara, 24 de Julho de 2013.

DADOS CURRICULARES
CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES

Nascimento: 11 de Agosto de 1982 – Recife/PE.

Filiação: Tarcísio Cavalcanti Chaves e Abigail de Andrade Lima Chaves.

2000/2005: Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Caruaru/ASCES.

2006: Participação no Programa de Aperfeiçoamento Continuado (PROAC) – Disciplinas de prótese total e fixa– Departamento de Materiais Dentários e Prótese - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

2007/2009: Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Concentração em Prótese – Curso de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Set-Dez/2012: Doutorado Sanduiche - Eastman Dental Institute/ UCL.

2009/2013: Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Concentração em Prótese – Curso de Doutorado - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Dedico este trabalho...

À ***Deus***, por cuidar da minha vida com tanto carinho.

Aos meus pais ***Tarcísio e Abigail***, por terem proporcionado o suporte necessário para que eu vença essa etapa da minha vida. Pelo amparo, dedicação, apoio incondicional às minhas decisões, pela minha formação pessoal e valores que me foram passados: humildade, sinceridade, educação e amor a Deus e à família. Foi com o apoio e amor de vocês que hoje consigo conquistar este sonho!

A minha irmã, ***Fabiana***, e aos meus avós, pela preocupação, companheirismo, carinho, amor e incentivo.

Ao meu querido marido ***Raphael***, pelo incentivo incondicional, apoio, carinho, compreensão, paciência e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Muito obrigada por tudo. Você foi muito importante nesta etapa da minha vida!

Agradecimentos especiais

A Profa. Dra. *Ana Lúcia Machado*, por acreditar em mim, pela confiança, incentivo e contribuição na minha formação profissional. A senhora é um exemplo de dedicação, competência e seriedade a docência e a pesquisa. Agradeço por todos os sermões que levei, aprendi muito!!!! Conviver com você foi um presente de Deus para mim, encontrei além de uma orientadora, uma amiga. Tenha certeza que todas as vezes que você me chamou a atenção, foram sempre para o meu bem. Obrigada por tudo e espero que a nossa amizade continue para todo o sempre!

Ao Prof. Dr. *Carlos Alberto de Souza Costa*, pela disponibilidade, incentivo e paciência. Obrigada por me deixar fazer parte do seu laboratório de pesquisa, foi muito bom para minha formação profissional e pessoal.

Ao Dr. *Vehid Salih*, com você aprendi a “trabalhar duro e viver de forma intensa (Play hard, work hard)”, obrigada por todos os ensinamentos.

Agradecimentos

As professoras e amigas, *Simone Xavier e Anamaria Pessoa Pereira Leite*, pela amizade, incentivo e, principalmente, por acreditar em mim. Obrigada!

A *Silvinha*, minha querida sogra, não tenho palavras para agradecer todo o seu apoio, orientações e companheirismo. Eu não poderia ter tido mais sorte do que ter você como minha sogra! Obrigada por me aceitar em sua família.

Ao amigos do ECC, em especial a *Daniela e o Marcos Ribeiro*, vocês são um presente de Deus.

Ao *curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral*, coordenado pela Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, muito obrigada por tornar possível a realização do meu trabalho.

A todos os *Professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral*, pelo apoio, amizade e ensinamentos. Obrigada pelo incentivo todos esses anos!

A *Profa. Dra. Ana Carolina Pero*, obrigada pelas palavras de apoio e carinho, que a nossa amizade seja eterna. Obrigada por tudo.

Ao *Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza* pela amizade, paciência e ensinamentos. Sua participação foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto. Muito obrigada por tudo!

Aos professores da disciplina de prótese removível *Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, Profa. Dra. Eunice Giampaolo, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, Profa. Dra. Janaina Jorge e Prof. Dr. Ewerton Mima* pela amizade, convivência e incentivo.

As amigas de infância *Dani Moroni, Amanda, Carol Fernandes, Izabela, Renatinha Sarmiento, Renata Da Fonte e Mariana*; E as amigas da faculdade *Fabiana, Duda, Carol Cavalcanti, Rafaela, Juliana Veras, Maradulce e Willyanne* muito obrigada pela convivência e apoio por todos estes anos. Sei que mesmo de longe, vocês torcem pela minha vitória. Obrigada por tudo!

Aos amigos do curso de pós-graduação *André Paleari, Cristiane Quishida, Fernanda Izumida, Cadu, Rodrigo Pereira, Antônio, Juliano, Patrícia, Ana Lúcia, Camila Zamperinni, Eduardo Moffa, Amanda Fucci, Filipe Abi Rached, Ana Paula Dias Ribeiro, Mariana de Almeida Basílio, Flávia Medeiros, Flávia Zardo Trindade* obrigada pela convivência e amizade durante todos esses anos.

Aos *amigos do laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, Fernanda Basso, Diana, Liege, Ana Paula Turrioni, Taisa Leopoldina* obrigada pela paciência, amizade, companheirismo e ensinamentos. As queridas amigas *Liege, Ana Paula Turrioni e Cláudia Huck, obrigada pela acolhida também em suas casas*, vocês são especiais e a convivência com vocês foi ótima! Cláudia Huck, eu aprendi muito com você, nossa convivência foi um presente de Deus para mim!

Aos *funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, em especial, Martinha, as Adelaides e Dulce*, obrigada pela amizade, foi muito bom conviver com vocês durante esses anos.

Aos *funcionários da Seção de Pós-Graduação Mara, Alexandre, Flávia e Rosângela*, obrigada pela gentileza e atenção.

À **FAPESP**, pela bolsa de doutorado (2010/08750-0), bolsa BEPE (2012/07994-9) e auxílio à pesquisa (2010/11764-3;).

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR)**, com a atual diretora Profª.Drª. Andréia Affonso Barretto Montandon e vice-diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, obrigada por proporcionar um excelente ambiente de trabalho para nós.

Chaves CAL. Avaliação in vitro da biocompatibilidade de resinas acrílicas para base de prótese e materiais reembasadores resilientes [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de 3 resinas acrílicas (RA) para bases de prótese sendo duas polimerizadas por energia de microondas (Vipi Wave-VW e Nature Cryl-NC) e uma fotoativada (Eclipse-E); e a biocompatibilidade de materiais reembasadores resilientes (MRR), sendo 2 à base de silicone (Ufi Gel P e Sofreliner S), 2 à base de resina acrílica (Durabase Soft e Trusoft) e 2 condicionadores de tecidos (Softone e Coe Comfort) por meio de análises do metabolismo celular, da morfologia celular, do padrão de morte celular, da proliferação celular e da expressão do fator de crescimento TGF β 1, da integrina α 5 β 1 e de citocinas. A análise das RA foi realizada com células L929; para os MRR, as análises foram realizadas utilizando-se células L929, e/ou HaCaT e/ou RAW 264,7. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, realizada ao nível de significância de 5%. Todos os materiais quando testados com eluatos não apresentaram efeitos citotóxicos, e quando testados em contato direto (MTT e azul de alamar) alteraram significativamente a viabilidade celular, tendo sido os menores valores observados para o material NC quando comparado ao E. Para os materiais reembasadores o T, S e C. Maior taxa de necrose e apoptose foram observadas para os eluatos de todos os materiais quando avaliados no período de 24 horas; além disso, foi demonstrado que os materiais avaliados podem desencadear a expressão do TGF β 1, da integrina α 5 β 1 e de proteínas inflamatórias (fator de necrose tumoral - TNF- α , da citocina IL-1 β e de 5 quimiocinas: CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2 e CXCL4). Sendo assim, de acordo com as limitações do presente estudo, pode-se concluir que a resina Nature Cryl resultou em menor viabilidade celular que a resina Eclipse e que os materiais Ufi Gel P e Sofreliner S apresentaram, em geral, melhor biocompatibilidade dentre os materiais reembasadores resilientes avaliados.

Palavras-chave: Citotoxicidade imunológica; Reembasadores de Dentadura, Teste de Biocompatibilidade.

Chaves CAL. In vitro biocompatibility of denture base acrylic resins and soft relin materials. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of 3 denture base acrylic resins with different polymerization methods (Eclipse, Vipi Wave and Nature Cryl) and the biocompatibility of soft lining materials, 2 silicone-based (Ufi Gel P and Sofreliner S), 2 acrylic-based (Durabase Soft and Trusoft) and 2 tissue conditioners (Softone and Coe Comfort), by analysing cell metabolism, cell morphology, pattern of cell death, cell proliferation and expression of growth factor TGF β 1, integrin α 5 β 1 and cytokines. For the acrylic resins, analyses were made with L929 cells, while for the resilient lining materials, analyzes were performed using L929, and/or HaCaT and/or RAW 264.7 cells. Results were statistically analyzed, at a significance level of 5%. The 24 and 48-h eluates from all materials were not cytotoxic to the cells. For the direct contact tests (MTT and Alamar Blue), a significant effect on cell viability was found, with the lowest values observed for materials NC when compared with E and between the reliners Trusoft, Softone and Coe Comfort. For all materials, increased rate of necrosis and apoptosis were observed for the 24 hs eluates. It was also demonstrated that all materials tested can trigger the expression of TGF β 1, α 5 β 1 integrin and inflammatory proteins (tumor necrosis factor -TNF- α , cytokine IL-1 β and 5 chemokines- CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2 and CXCL4). Thus, within the limitations of this study, it can be concluded that the denture base acrylic resin Nature Cryl resulted in lower cell viability compared to the Eclipse resin and that the materials Ufi Gel P and Sofreliner S showed better biocompatibility among the soft liner materials evaluated.

Key-words: Immune cytotoxicity; Denture relin, Biocompatibility Test.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	13
2 Proposição.....	22
3 Capítulos.....	23
3.1 Capítulo 1.....	24
3.2 Capítulo 2.....	40
3.3 Capítulo 3.....	75
3.4 Capítulo 4.....	99
4 Discussão.....	133
4.1 Análise das resinas acrílicas para base de prótese pelo método de MTT e materiais reembasadores resilientes pelos métodos de MTT, MEV e Citometria de fluxo.....	134
4.2 Análise da influência dos materiais reembasadores resilientes na proliferação celular, integrin $\alpha 5\beta 1$ e no fator de crescimento TGF $\beta 1$.....	148
4.3 Análise da influência dos materiais reembasadores resilientes na expressão de proteínas inflamatórias.....	152
5 Conclusão.....	159
6 Referências.....	162

A rectangular box with a blue border containing a grayscale microscopic image of a dense field of cells. The cells are irregular in shape and appear to be interconnected, possibly representing a tissue or a cell culture. The word "Introdução" is overlaid on the right side of the image in a bold, italicized serif font.

Introdução

1 Introdução

A reação de polimerização das resinas acrílicas para base de prótese é fator crucial para se obter propriedades físicas, mecânicas e biológicas. A polimerização das resinas acrílicas iniciam com o peróxido de benzoila, responsáveis pela formação de radicais livres. Essas espécies reativas (por ex. radicais livres) são adicionadas a uma molécula de monômero, abrindo as duplas ligações dos metacrilato de metila para formar um novo centro de radicais. Isto cria uma reação em cadeia no qual o monômero é ligado aos radicais livres do polímero²⁹. De acordo com o método utilizado para ativar a reação de polimerização das resinas acrílica, essas podem ser classificadas em: polimerizadas por calor (utiliza água quente ou energia de micro-ondas), autopolimerizáveis (ativação química em temperatura ambiente) e fotopolimerizável (ativado por luz visível)²⁹.

A reação de polimerização dos monômeros em polímeros das resinas acrílicas não é completa e possuem monômeros não reagidos (monômeros residuais), que são liberado na cavidade oral, influenciando sua biocompatibilidade²⁴. Reações adversas e alergias de contato a resinas acrílicas tem sido relatadas na literatura^{2,5,47}, como a sensação de queimação na área em contato com a prótese, que é frequentemente relatado pelos pacientes^{2,5}. Além disso, o sintoma clínico mais frequente observado é o edema labial¹³⁵.

Vários estudos foram realizados para avaliar a citotoxicidade das resinas acrílicas para base de prótese e seus componentes^{6,10,14, 24,31,38, 44,66,72,73,90,91,92,106,141,144,152,156,160}. Em uma revisão da literatura³², entretanto, demonstrou que poucos estudos comparam a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de próteses polimerizadas por banho de água, por energia de micro-ondas^{72,73,144} ou por luz visível^{66,106}. Enquanto as resinas ativadas por energia de micro-ondas são compostas pelo pó de polimetil metacrilato (PMMA) e o monômero de metil metacrilato (MMA), as resinas ativada por luz são compostas por uretano dimetacrilato (UDMA). A resina Eclipse, ativada por luz, um sistema de pasta que não precisa ser misturado¹⁰⁰. A composição é baseada em uretano oligômeros, material frequentemente utilizado em produtos odontológicos. Poucas informações sobre a citotoxicidade das resinas acrílicas polimerizadas por luz^{66,106} e, nenhum estudo que compare esse novo sistema (Eclipse) e resinas acrílicas polimerizadas com energia de micro-ondas, foi encontrado na literatura.

Alguns pacientes que utilizam próteses removíveis, entretanto, apresentam dificuldade de utilização devido a fatores como à reabsorção do rebordo alveolar, bruxismo, xerostomia e sensibilidade^{101,115}. Além disso, muitas vezes, essas próteses são colocadas em contato com áreas da mucosa oral dilaceradas, inflamadas, traumatizadas ou após cirurgias (por ex. implantes)^{115,127,131}. Para proporcionar melhor adaptação e conforto aos pacientes surgiram, então, os materiais reembasadores resilientes que podem ser classificados de acordo com suas composições em resinas acrílicas plastificadas, à base de silicone ou condicionadores de tecido¹¹⁵.

Os reembasadores resilientes à base de resina acrílica são compostos de pó contendo poli(etil metacrilato) e líquido contendo monômero e plastificante (ésteres de ftalato)^{53,115}. Já os reembasadores à base de silicone apresentam composição similar à dos materiais de moldagem (vinil poli siloxano)²⁸. Sua resiliência constitui propriedade intrínseca do polímero e não depende da presença de plastificantes^{30,105, 120}. Outros materiais resilientes têm sido desenvolvidos especificamente como condicionadores de tecidos^{115,116,138}, sendo compostos de um pó, que consiste em poli(etil metacrilato) ou co-polímero relacionado. O líquido não contém monômero^{65,115} sendo composto por plastificantes, como ftalatos, e etanol^{58,113,114,130}. A mistura desses componentes resulta na formação de um gel que se adapta aos tecidos bucais^{58,65,115,130}. Testes de Patch foram realizados em pacientes que apresentaram esses sintomas para confirmar a reação alérgica a resina acrílica e seus produtos,^{2,5,47} essa reação no tecido tem sido relacionada com monômeros e produtos de degradação que são liberados^{48,60,78,107,132, 149,151,159,164}.

Tem sido demonstrado que os materiais reembasadores resilientes, à base de resina acrílica ou silicone, liberam componentes residuais como monômeros, plastificantes e produtos de degradação^{22,23,146}. Os condicionadores de tecidos também liberam plastificantes e álcool^{28,58,113,114,116}. Substâncias liberadas na saliva, a partir desses materiais, podem ser transportadas para a mucosa oral e/ou ao trato gastrointestinal e causar reações adversas como dor, vesículas, ulcerações, sensação de ardência e vermelhidão^{103,118, 170}. Assim, estudos têm sido realizados para avaliar a biocompatibilidade dos reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos, por meio de testes que permitem avaliar possíveis efeitos citotóxicos após a exposição das células às substâncias liberadas (eluatós) por esses materiais^{74,81,128,130,154}. A literatura, entretanto, revela que ainda existe pouca informação sobre a citotoxicidade dos materiais

reembasadores resilientes indicando a necessidade de mais estudos. Apesar dos condicionadores de tecidos e dos reembasadores resilientes à base de resina plastificada apresentaram-se, em geral, mais citotóxicos, os resultados diferem entre os estudos.

A literatura consultada demonstra, ainda, que poucos estudos avaliaram os efeitos quando há o contato direto entre os materiais e as células^{1,62,79,93,124,157}. Esse aspecto é particularmente importante tendo em vista que esses materiais também têm sido amplamente utilizados em áreas de tecidos ulcerados e inflamados, pela ação mecânica de próteses mal adaptadas¹¹⁵, em próteses obturadoras após cirurgias maxilo-faciais^{19,127,131}, em casos que apresentam áreas recém operadas, regiões com lesões crônicas, trauma na mucosa bucal, bruxismo, pacientes com avitaminoses ou doenças debilitantes⁵⁵ e em próteses imediatas ou durante o período de osseointegração de implantes^{137,42}.

Nos estudos sobre biocompatibilidade dos materiais reembasadores resilientes, o teste de MTT tem sido um dos mais utilizados^{63,74,81,93,130}. Esse teste baseia-se na quantificação da atividade enzimática mitocondrial, principalmente da enzima desidrogenase succínica, e mensura a conversão do sal de metil- tetrazolium em cristais de formazan, de cor azul escura, facilmente detectado por espectrofotometria¹²⁸. É um teste simples, sem necessidade de radioisótopo, com poucas etapas e tempo laboratorial e tem sido relacionado à quantidade de células viáveis¹²⁸. Outro teste utilizado tem sido o azul de alamar, esse fornece uma precisão da viabilidade/proliferação celular, e a mudança de cor do meio de cultura pode ser medida fluoro/colorimetricamente. O sistema incorpora um indicador de oxido-redução que fluoresce e muda de cor em resposta à redução química do meio de cultura em contato com as células, que teve essa redução como resultando do crescimento/proliferação celular¹²². O azul de alamar é solúvel, estável em meio de cultura e não-tóxico. Por isso, é possível monitorar continuamente as mesma células, não alterando a viabilidade celular com o tempo⁴⁹. O azul de alamar tem duas vantagens sobre o ensaio de MTT: Primeiro sua mudança de cor pode ser detectado tanto pela espectrofotometria ou fluorometricamente, que é mais preciso¹⁰⁷. Em segundo lugar, uma vez que não é tóxico para as células, é possível avaliar a viabilidade celular em mais de uma ocasião. No entanto, o azul de alamar é um ensaio mais caro do que o MTT, por isso a maioria das pesquisas tem utilizado esse último¹⁰⁷. Para complementar os resultados quantitativos obtidos nos testes de viabilidade celular, análises em microscópio eletrônico de varredura (MEV) também têm sido

realizadas para avaliar alterações morfológicas nas células, causadas por diferentes materiais odontológicos^{39,87}.

Outro tipo de análise que tem sido considerada importante para avaliar a citotoxicidade de materiais odontológicos é a identificação do padrão de morte celular, apoptose ou necrose¹⁰⁷, por citometria de fluxo com anexina-V e iodeto de propídio. Segundo Cimpan et al.^{33,34}, quando o material causa apoptose, os tecidos que estão em contato com a prótese terão maiores condições de se adaptar às modificações por ela induzidas. Por outro lado, quando o material causa necrose, o fenômeno inflamatório resultante desse tipo de morte celular pode induzir reações teciduais mais severas. Dessa forma, a morfologia e o padrão de morte celular constituem aspectos importantes a serem avaliados. Apesar da citotoxicidade dos materiais reembasadores resilientes já ter sido investigada, as alterações morfológicas e os mecanismos de morte celular por eles induzidos ainda não foram elucidados.

Como já mencionado, esses materiais são colocados em contato direto com a mucosa inflamada/ferida ou dilacerada após cirurgias. A reparação tecidual após uma ferida é complexa e inclui proteínas que são envolvidas no processos de sinalização, proliferação celular, migração, apoptose e remodelação dos tecidos⁷⁵. As integrinas, presentes ao longo da membrana celular, são moléculas importantes nos processos que medeiam a adesão célula-célula e da comunicação célula-matriz extracelular. Fazem, também, as conexões transmembranas ao citoesqueleto e ativam muitas vias de sinalização intracelular^{16,67}. Atualmente são conhecidas 24 diferentes integrinas^{61,67}, entre elas foram identificadas, em queratinócitos e fibroblastos, as integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$, que participam do processo de reepitelização durante a reparação de feridas²⁷. Como um dos receptores de fibronectina, a integrin $\alpha 5\beta 1$ é altamente expressa em fibroblastos humanos e promovem a motilidade e sobrevivência celular^{97,171}. A matriz pericelular dos fibroblastos também possuem proteínas adesivas de mutidomínios, incluindo a fibronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos que modulam as células à matriz extracelular rica em colágeno^{64,89}. Em contraste, o principal componente da matriz extracelular é o coágulo de fibrina que formam fibras e contém glicoproteínas adesivas derivadas do plasma (fibronectina e vitronectina). Além disso, a matriz extracelular presente dentro do microambiente do fibroblasto servem como conduto para a migração de células para dentro da ferida. Para a migração, os fibroblastos mudam a interação com a matriz extra celular sendo capaz de reconhecer as novas

proteínas contidas na nova matriz da área ferida. Para facilitar esse processo, os fibroblastos utilizam, principalmente, receptores da família das integrinas^{89,102}.

Outras proteínas importantes na reparação de feridas são os fatores de crescimento. Alguns estudos tem sugerido que essas proteínas e seus receptores são reguladores importantes na reparação tecidual^{51,94}. Sabe-se que as integrinas são responsáveis por regular alguns fatores de crescimento, entre eles o TGF- β , uma citocina pleitrófica que medeia a variedade da função, como a proliferação e diferenciação em vários tipos celulares. São conhecidas três formas isoformicas do TGF- β , são elas: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3^{148,102}. São secretada inativada com um complexo entre duas proteínas-LAO e LTB, para a ativação é necessária a dissociação do complexo proteico, que ocorre em pH baixo ou através de espécie reativa de oxigênio, proteases, trombospondina 1 ou algumas integrinas¹⁰². Sabe-se que, a integrina $\alpha_5\beta_1$ é expressa durante o processo de re-epitelização de feridas e implicam no aumento da expressão do TGF- β por queratinócitos e fibroblastos¹⁰².

Tem sido demonstrado, também, que monômeros presentes em polímeros utilizados na Odontologia podem ativar os macrófagos a produzirem citocinas que são responsáveis pelo início, mediação e propagação do processo inflamatório^{12,123,140}. Além disso, essas proteínas reguladoras estão envolvidas em vários outros processos imunológicos tais como ativação de linfócitos, proliferação, diferenciação, angiogênese e apoptose¹². In vivo, a ação dos compostos liberados pelos materiais odontológicos ocorre nas células das camadas mais superficiais dos tecidos como polpa, gengiva e mucosa bucal¹⁴⁰. As células e tecidos que apresentam quadro de irritação química ou patológica liberam metabólitos ou moléculas sinalizadoras para iniciar ou acentuar as reações em cascata, as quais levam a irritação do tecido in vivo¹⁴⁰. Segundo Moharamzadeh et al.¹⁰⁷ (2009) a quantificação de mediadores pró-inflamatórios em sobrenadante de cultura celular expostas a materiais à base de resina é um método sensível e eficiente que pode mostrar uma ligação bioquímica direta entre os parâmetros mensurados in vitro e os efeitos clínicos tais como inflamação in vivo. Liu et al.⁹⁶ (1999) avaliaram o efeito do metil metacrilato (MMA), comumente utilizado em produtos médicos e odontológicos, sobre culturas de células de sangue humano. Foram avaliadas a transformação de linfócitos e a produção de citocinas (interleucina 6-IL-6; interferon- γ -IFN- γ ; fator de necrose tumoral-TNF- α). Os resultados demonstraram que o MMA pode influenciar a produção de citocinas pelas células *in vitro*, indicando que esse composto tem múltiplos efeitos regulatórios

nas reações imunológicas do sangue humano. Bailey et al.¹² (2006) avaliaram a liberação de TNF- α e IL-1 β , em macrófagos Raw 264.7, expostos a eluatos obtidos a partir de 4 sistemas adesivos à base de resina, com diferentes formulações. Moharamzadeh et al.¹⁰⁹, em 2008, utilizando o teste imunoenzimático ELISA, também observaram que a exposição de um modelo de mucosa bucal obtida em laboratório, por meio de engenharia de tecidos, a uma resina contendo o monômero trietileno glicol dimetacrilato, aumentou significativamente a quantidade de IL-1 β liberada, quando comparada ao tecido exposto a resinas contendo outros monômeros. Labban et al.⁸⁶ (2008) avaliaram as respostas de fibroblastos gengivais humanos frente a 4 tipos de materiais à base de resina indicados para a confecção de próteses fixas provisórias. Dentre os materiais, 3 eram autopolimerizáveis compostos de bis-acril, polietil metacrilato ou polimetil metacrilato e 1 era termopolimerizável a base de polimetil metacrilato. Os níveis de expressão para as resinas a base de bis-acril e polietil metacrilato foram significativamente maiores que o controle para os fatores TNF- β e TNF- α , respectivamente, indicando que esses materiais podem estimular algumas respostas inflamatórias. Com relação aos plastificantes, Jepsen et al.⁶⁹ (2004), observaram que todos os monoftalatos estudados estimularam a produção de citocinas, em diferentes níveis e que, em altas concentrações, suprimiram essa produção. Essa supressão ocorreu, provavelmente, devido ao efeito tóxico sobre as células, demonstrado nas análises microscópicas que mostraram lise das membranas. Os estudos citados demonstram que substâncias liberadas por produtos odontológicos podem induzir a secreção de moléculas mediadoras de reações inflamatórias, dependendo do tipo de composto e da concentração liberada. A literatura mostra, no entanto, que não se tem informações se os produtos liberados por materiais reembasadores resilientes podem alterar a produção de citocinas.

Tem-se utilizado para avaliar a expressão de citocinas/fatores de crescimento kits que possibilitam testar múltiplas proteínas em uma única vez (Proteome Profiler™ Array). Labban et al.⁸⁶ (2008), avaliaram a expressão de citocinas/fatores de crescimento através de um kit para detecção de múltiplas proteínas (Ray-Biotech, Inc) expressas por fibroblastos de gengiva humana quando em contato com quatro resinas acrílicas para confecção de provisórios (Chem-Bis/Protemp 3 Garant, Chem-PEMA/SNAP Acrylic, Chem-PMMA/Jet Acrylic, Heat-PMMA/Hi-D). Os autores verificaram que, a resina Protemp 3 Garant foi melhor do que o controle aumentando a proteína GRO (regulação de oncogenese), proteína para atração de monócitos (MCP-1), e fator de necrose tumoral (TNF). Para a resina SNAP Acrylic a expressão de

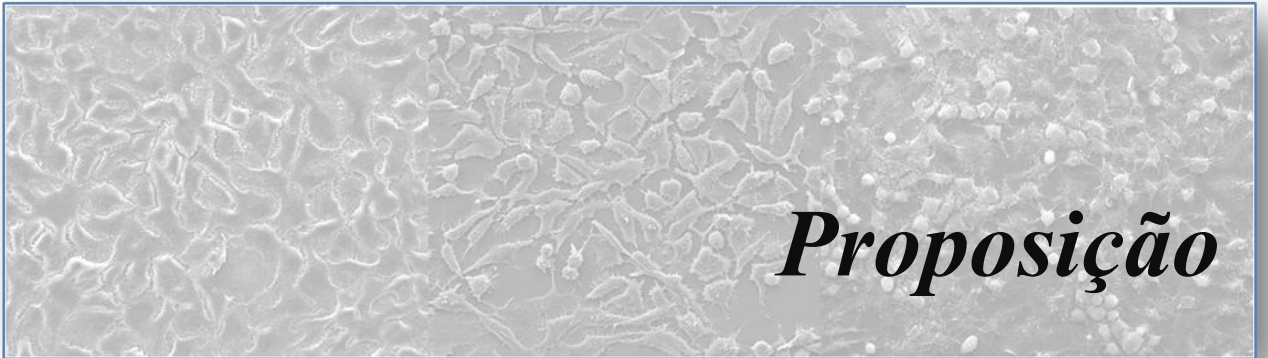
citocinas/fatores de crescimento foi significativamente menor do que para o controle e para a resina Protemp 3 Garant houve diminuição da IL-8. A resina Jet Acrylic expressou a IL-13, IL-1, IL-2 e IL-5 mais do que o controle. Níveis significativamente maiores do que o controle foram observados para GRO e IL-13 expressas pela resina HI-I.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua geralmente na fase inicial durante a inflamação, ativando células locais³⁶, e sua liberação é indicativa de efeitos pró-inflamatórios. Segundo Porto¹³⁴ (2012), o TNF- α é produzido por diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos, células T, células musculares lisas, adipócitos e fibroblastos. As respostas biológicas relacionadas ao TNF- α ocorrem por meio de ligação a receptores existentes na membrana de todos os tipos de células (exceto eritrócitos). Esses receptores diferem nas suas afinidades de ligação, bem como nas vias de sinalização intracelular, levando a apoptose, a ativação do fator de transcrição NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas^{45,133}. A interleucina 1 β (IL-1 β), também uma citocina, é produzida por vários tipos de células em resposta a estímulos como inflamação, agentes infecciosos ou endotoxinas microbianas¹⁰⁹. É conhecida por ser uma citocina pró-inflamatória que possui múltiplas atividades biológicas ligadas à imunopatologia de doenças inflamatórias crônicas e agudas¹⁶³. A IL-1 β , assim como a TNF- α , são citocinas críticas envolvidas na inflamação e sua inibição tem sido considerada como estratégia para o tratamento de doenças inflamatórias²⁵.

A inflamação também causa a liberação de quimiocinas que induzem a migração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos e macrófagos para a área afetada^{36,155}. As quimiocinas podem ser divididas em 4 grupos: CCL, CXCL, CX3CL e CL que se ligam aos seus receptores CCR, CXCR, CX3CR e CR, respectivamente^{83,158}. Todas as quimiocinas apresentam os mesmos elementos estruturais incluindo resíduos de cisteína que formam ligações (pontes dissulfeto) na estrutura terciária. Assim, nas quimiocinas (CCL, CXCL, CX3CL e CL), X é o número de amino ácidos entre os resíduos de cisteína no local do terminal NH₂- da molécula¹⁷². As quimiocinas CXCL são mais ativas sobre células polimorfonucleares, células T e B, enquanto as quimiocinas CCL exercem sua ação mais nos eosinófilos, monócitos, basófilos células T e NK. A IL-8, uma quimiocina CXCL, é uma boa quimioatratante para neutrófilos e, em menor magnitude, para eosinófilos e monócitos¹¹. Por outro lado, a eotaxina⁷⁷, uma quimiocina CCL, atua, predominantemente, em eosinófilos e basófilos mas não em neutrófilos^{26,167}. Embora haja

especificidade, nenhuma quimiocina inflamatória é ativa unicamente em uma determinada população de leucócitos.

Diante do exposto, foram realizados estudos que avaliaram o possível efeito citotóxico de resinas acrílicas para base de próteses, polimerizadas por luz e energia de micro-ondas (Capítulo 1). Foram avaliados, também, diferentes materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos quanto a citotoxicidade, tipo de morte e morfologia celular (Capítulo 2); expressão de integrinas, fatores de crescimento e proliferação celular (Capítulo 3); e expressão de cito/quimiocinas (Capítulo 4).



2 Proposição

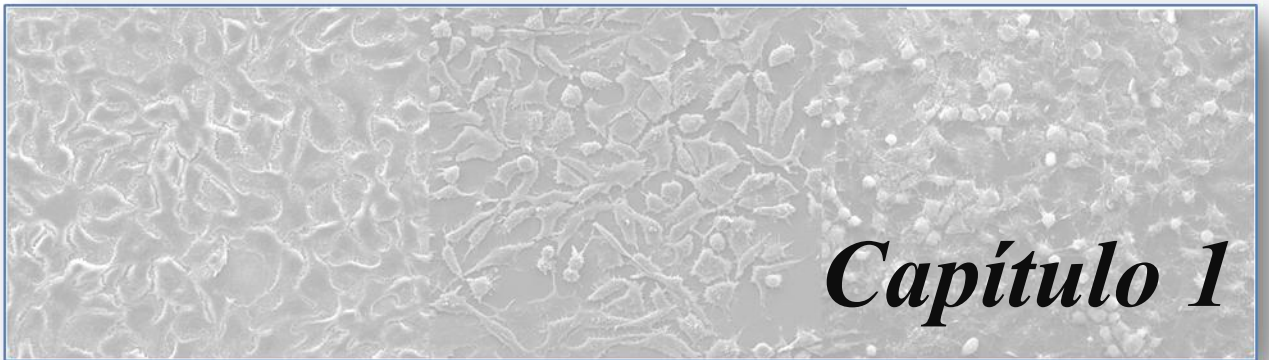
De acordo com as informações apresentadas na seção anterior, este trabalho teve como objetivo:

1) Avaliar a citotoxicidade de duas resinas para base de prótese polimerizadas por micro-ondas e uma polimerizada por luz, por meio do teste de MTT com eluato e contato direto dos materiais, nas células L929 por 24 hs.

2) Verificar os efeitos citotóxicos de quatro materiais reembasadores resilientes e dois condicionadores de tecidos, em cultura de células (L929, HaCaT e RAW 264.7), por meio de análises da viabilidade celular (MTT), da morfologia celular (MEV) e do padrão de morte celular (citometria de fluxo). Os testes foram realizados após exposição das células a eluatos ou ao contato direto com os materiais, em períodos de 24 e 48 hs.

3) Analisar a expressão da integrina $\alpha_5\beta_1$ e do fator de crescimento TGF- β_1 de células L929 quando em contato direto entre quatro materiais reembasadores resilientes e dois condicionadores de tecidos, por 24 e 48 hs, com células L929. Foi avaliado, também, os efeitos desses materiais sobre a proliferação celular pelo teste azul de alamar.

4) Avaliar in vitro a expressão de citocinas por macrófagos (RAW 264.7), expostos aos eluatos de 24 ou de 48 hs, de quatro materiais reembasadores resilientes e dois condicionadores de tecidos, por meio do Kit Mouse Cytokine Array Panel A. As cito/quimiocinas mais expressas, detectadas no kit, foram quantificadas através do ensaio de imunoenzimático (ELISA) .



Capítulo 1

3.1 Capítulo 1

In vitro cytotoxicity of microwave-polymerized and light-activated denture base resins

Carolina de Andrade Lima Chaves, DDS, MSc,^a Juliana Cristina Sardella,^b Carlos Alberto de Souza Costa, DDS, MSc, PhD,^c and Ana Lucia Machado, DDS, MSc, PhD,^d

Araraquara Dental School, Unesp – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil

^aDoctoral Student, Department of Dental Materials and Prosthodontics, Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School.

^bUndergraduate Student, Department of Dental Materials and Prosthodontics, Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School.

^cFull Professor, Department of Physiology and Pathology, Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School.

^dFull Professor, Department of Dental Materials and Prosthodontics, Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School.

Corresponding author:

Dr Ana Lucia Machado

Department of Dental Materials and Prosthodontics

Araraquara Dental School, UNESP

Rua Humaitá, n° 1680, Araraquara

Sao Paulo, CEP: 14801-903

BRAZIL

Fax: 55-016-33016406

E-mail: cucci@foar.unesp.br

Submissions Being Processed for Author Ana Lucia Machado, DDS, MSc, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display
10 results per page.

+ Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links View Submission Send E-mail		In vitro cytotoxicity of microwave-polymerized and light-activated denture base resins	May 05, 2013	May 05, 2013	Submitted to Journal

Journal of Prosthetic Dentistry

In vitro cytotoxicity of microwave-polymerized and light-activated denture base resins

Abstract

Statement of problem: Although the cytotoxicity of denture base polymers has been widely assessed, data about the toxic effects of acrylic resins activated by microwave energy or light are still missing. **Purpose:** To comparatively evaluate the in vitro cytotoxicity of two microwave-polymerized and one light activated denture base acrylic resins.

Material and methods: Materials tested were the microwave-polymerized acrylic resins Vipi Wave (VW) and Nature Ceryl MC (NC), and the light-activated resin Eclipse (E). Material E was tested with and without application of the air barrier coating (ABC). Disk specimens (10 × 1 mm) of each material were prepared (n=24), and the cytotoxic effects were assessed using MTT assay, after the cells had been exposed to 24-h eluates from the materials or after direct contact with the specimens for 24h. Cell viability was expressed as percentages of controls (cells exposed to

medium without eluates or acrylic specimens). Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) ($p= 0.05$), and HSD Tukey's test. **Results:** No significant differences among the materials ($p>0.05$) were found when the MTT tests were performed using the eluates. For the direct contact tests, all acrylic resin materials reduced the cell viability compared to control. The mean value for NC ($56.1\% \pm 12.8$) was significantly lower ($p<0.001$) than the Eclipse resin tested with (81.0 ± 15.4) or without (73.0 ± 9.9) ABC, which did not differ from each other. No significant differences were found when VW was compared with the other resins ($p>0.05$). **Conclusions:** The viability of the L929 cells was not influenced by exposition of these cells to 24-h eluates obtained from all denture base resins. For all materials, the direct contact with the L929 cells for 24-h resulted in a significant reduction of cell viability, with more pronounced effects for NC resin compared to resin E.

Clinical implications. The results of this study indicate that the direct contact of L929 cells with the denture base resins evaluated, for short (24 h) period, caused a reduction in their metabolism. It was also demonstrated that the percentage of cell viability was higher for the resin Eclipse, suggesting that this material would represent an alternative to PMMA denture base resins in patients who have sensitivity or allergy to methyl methacrylate monomer.

Keywords: Removable dentures; acrylic resins; cytotoxicity.

Introduction

The polymerization reaction of the denture base acrylic resins represents a crucial factor in obtaining optimal physical, mechanical and biological properties. A characteristic of free radical polymerization is that the activation of the initiator (benzoyl peroxide) is required. Polymerization takes place as the reactive species (e.g. free radical) is added to a monomer molecule by opening the double bonds of the methyl methacrylate to form a new radical center. This creates a chain reaction where the monomer is attached to the polymer free radical.¹ According to the activation method used to initiate the polymerization, the denture base acrylic resins can be classified as heat polymerized (using hot water or microwave energy), autopolymerized (chemical activation at room temperature) and photopolymerized (visible light activation).¹

Regardless the polymerization system, the conversion of monomers into polymers is not complete and denture base materials always contain certain amount of unreacted free monomers, which may be released to the oral cavity, influencing their biocompatibility.² Adverse

reactions and contact allergy to dental acrylic resins have been reported in the literature.³⁻⁵ A burning sensation in the area immediately beneath the prosthesis is the symptom most frequently reported by the patients,³⁻⁵ who also complain this kind of discomfort in the tongue, oral mucosa, and oropharynx.³ Oral mucosa erythema, vesicles and ulcerations,³⁻⁵ as well as labial edema are the most frequent clinical signs observed.⁶ Patch tests performed in patients with these alterations demonstrated allergic reaction to acrylic resins and their components.³⁻⁵ These tissue reactions have been ascribed to monomers and other degradation products that are released from resinbased materials.⁷⁻¹⁶

Although several studies have been conducted on the cytotoxicity of denture polymers and their constituents,^{2,17-34} a recent review of the literature³⁵ demonstrated that, to date, only few investigations have compared the cytotoxicity of hot water bath-polymerized denture base acrylic resins with materials activated by microwave energy^{23,27,29} or light irradiation.^{25,31} While the microwave-polymerized acrylic resins are usually based on polymethyl methacrylate (PMMA) powder and methyl methacrylate monomer (MMA) liquid, the light activated materials are composed of urethane dimethacrylate (UDMA). More recently, a brand new system of light activated denture base acrylic resins (Eclipse), which is a paste-type resin and requires no mixing, was developed.³⁶ In this system, the baseplate used for the occlusal rims becomes part of the final denture, which is in contact with the supporting tissues. The composition of the resin Eclipse is urethane-based oligomers, a class of materials that have found wide acceptance for various dental applications. To date, there is little information on the cytotoxicity of light activated denture base acrylic resins^{25,31} and none has compared this new system with microwaved-polymerized materials. Thus, the aim of this in vitro study was to evaluate the cytotoxicity of two microwave-polymerized and one light activated denture base acrylic resins.

Materials and Methods

Materials

Two microwave-polymerized and 1 light-activated denture base acrylic resins were selected for this study. Vipi Wave (Lot #0312051; Dental Vipi Ltda. Ind. e Com. Impor. e Exp. de Artigos Odontológicos, São Paulo, SP) is based on PMMA (powder) and MMA (liquid), containing the cross-linking agent ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), and is polymerized in a microwave oven (500 W) for 20 min at 20% power followed by 5 min at 90% power. Nature Cryl MC (Lot #0312051; GC America Inc., Alsip, IL, USA) is also a microwave-polymerized

denture base acrylic resin, but the powder is composed of a poly (methylmethacrylate/ethylacrylate) copolymer and the liquid is based on MMA without a cross-linking agent. This material is polymerized in a microwave oven at 500 W for 3 minutes. Eclipse (Lot #0312051; Dentsply Trubyte, York, Pa, USA) is a paste-type light-activated acrylic resin that is polymerized in its specific unit (Enterra VLC Curing Unit; Dentsply Intl, York, PA, USA) for a total of 20 minutes (14 minutes one side and 6 minutes on the opposite side). Eclipse is provided with an air barrier coating (Eclipse ABC; Dentsply Trubyte) to be applied on the resin surface and prevent oxygen inhibition. In this study, Eclipse was tested with and without the air barrier coating application.

Specimen preparation

To prepare standardized specimens (10×1 mm) of the microwave-polymerized acrylic resins Vipi Wave and Nature Cryl MC, silicone (Optosyl Confort, Heraeus Kulzer, Dormagen, Germany) patterns were obtained using a metal mould. These patterns were then invested in microwave flasks (VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda Pirassununga, SP, Brazil) with stone type III. The silicone patterns were removed, the powder and the liquid of the acrylic resins were mixed (Vipi Wave - 1 g/0.47 mL; Nature Cryl - 1 g/0.43 mL), and the mixture was inserted into the stone moulds, packed and microwaved-polymerized according to the manufacturers' instructions. After polymerization, the specimens of each resin (n=24) were removed from the flasks. In the case of the light-activated resin Eclipse, the specimens (10×1 mm) were obtained as described previously.³⁶ Briefly, a stainless steel mould was placed on a highly polished metal plate, lubricated with model release agent (Eclipse; Dentsply Trubyte), and heated in an oven (Conditioning Oven; Dentsply Trubyte) at 55°C. The Eclipse original baseplate resin, which is a single component supplied as a pre-packaged sheet, was adapted in the cavity (10×1 mm) of the stainless steel mould using finger pressure and a roller was applied over the material to minimise air inclusions. A second lubricated and pre-heated metal plate was placed on the top of the resin, the assembly was clamped, and excess flash was removed. For half of the Eclipse specimens (n=48), the air barrier coating (Eclipse ABC; Dentsply Trubyte) was applied on the resin surface. For the other half (n=24), a glass slide was placed over the specimen surface to prevent oxygen inhibition.³⁷ The metal mould was placed in the centre of the rotating table of the light-curing unit, and the resin

was polymerised using the recommended Flipper/Base cure cycle (14 min). After the mould was cooled to room temperature, the other side of the specimen was either coated with Eclipse Air Barrier Coating or covered by a glass slide. The mould was inserted into the Enterra unit, the material was polymerised using the BP Tissue Side cure cycle (6 min), and then allowed to bench-cool, followed by immersion in water to allow specimen removal. Thereafter, where appropriate, the Eclipse ABC coating was removed using water and a brush. The denture base acrylic resin specimens were stored in 50 mL of distilled water for 48 hours at 37°C²⁹. Before the cytotoxicity tests, all specimens were ultrasonically cleansed in distilled water for 20 min and kept for additional 20 min under ultraviolet light irradiation to prevent bacterial contamination²⁹.

Cell culture

L929 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mmol/L glutamine (Gibco). The cultures were maintained in 75cm² culture flasks at 37°C in a humidified 5% CO₂ balanced-air incubator with routine passage every 3 days.

Cytotoxic tests

Eluate preparation

Each specimen was extracted in 3 mL DMEM medium supplemented and without serum as recommended by ISO³⁸. Extraction was performed in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C for 24 hours³⁹. Fresh culture medium applied on the cultured cells was used as the negative control.

Exposure of cells to eluates

The L929 cells were plated in 96-well plates at a concentration of 1.0×10^5 cells/mL and incubated in 100 µL culture medium, in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C for 24 h. Then, the culture medium was replaced by 100 µL of eluates obtained from the denture base resins. The cells in contact with the eluates were incubated for 24 h.

Direct contact of cells with the denture base resins

Others specimens of each denture base resin were placed in wells of 24-well plates. Then, the L929 cells (1×10^5 cells/mL) were seeded on these specimens, which were incubated in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C for 24 hours³⁸.

MTT assay

For both, eluates and direct contact tests, after 24 h period of cell growth in either the control or the test culture medium, the eluates in contact with the cells were replaced by 900 µL of plain DMEM plus 100 µL of the MTT solution (5 mg/mL sterile phosphate buffered saline - PBS)⁴⁰, and cells were incubated for another 4h at 37°C. Thereafter, the culture medium with the MTT solution was aspirated and replaced by 600 µL of acidified isopropanol solution (0.04 N HCl) in each well to dissolve the blue crystals of formazan in the viable cells. Two 100 µL aliquots of each well were transferred to the wells of 96-well plates. Cell viability was evaluated by spectrophotometry as being proportional to the absorbance measured at 570 nm wavelength with an ELISA plate reader (Multiskan; Ascent 354, Lab systems CE, Les Ulis, France). Results of MTT assay were expressed as percentage of viable cells yielded by the different denture base resins compared to the untreated controls. All the experiments were performed in triplicate in three different experimental days.

Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) ($p = 0.05$). SPSS software (Version 16, SPSS Inc., Chicago, 163 IL, USA) was used for the statistical analyses.

Results

Table I shows the means and standard deviations of the results from the MTT assay when the cells were exposed to eluates or maintained directly in contact with the tested materials. Results are expressed as percentage of control (cells exposed only to fresh culture medium – 100% viability). For the eluate test, the one-way ANOVA revealed that there were no significant differences among the materials ($p > 0.05$). Regarding the direct contact test, all acrylic resin materials reduced the cell viability compared to control. The mean value for Nature Cryl MC was significantly lower than the Eclipse resin ($p < 0.001$), tested with or without air barrier coating, which did not differ from each other. No significant difference was observed when Vipi Wave was compared to the other denture base resins.

Discussion

In the present study, cell culture was used to evaluate the cytotoxicity of the denture base acrylic resins because this kind of methodology is repeatable, easy to handle and to keep under a controlled environment,¹² and has been widely used.^{2,12,16,19,20,23,25-27,29,31,35} Although cells from primary cultures have a more normal phenotype and may correlate to in vivo response more accurately, the cell number is often very low and their life span is limited.²⁶ Permanent cell lines, such as L929 used in this study, are easily maintained in culture, the variation among donors is eliminated, and good reproducibility is achieved.²⁵ Additionally, L929 cells have been used to assess the cytotoxicity of denture base acrylic resins^{24,27,29,30} and are recommended by ISO specification.³⁸ Tests with cultured fibroblasts may also simulate clinical conditions where⁹ traumatic ulceration of epithelium occurs, following denture placement, thus exposing these cells directly to the denture base resins or to the substances released by them.

To evaluate the biological effects of denture polymers, different in vitro protocols have been proposed,¹² such as the direct contact tests, where the experimental material is directly applied in contact with cultured cell system without interposition of any barrier,^{17,18} and extract tests, in which the cells are exposed to eluates obtained from the resinous materials.^{20,21,23,25,27,29,30} Therefore, in the present investigation, both tests (direct contact and eluate) were performed to provide complementary information about the toxic effects of the denture base resins on the cells.

Several colorimetric methods have been used to evaluate the cytotoxicity of biomaterials, among them the MTT assay,^{19,25,27,30,31} which assess the cell viability by cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase (SDH) activity that is a measure of cell mitochondrial respiration.⁴⁰ This assay is fast, objective, reliable and does not involve the incorporation of radioisotopes that demands expensive special equipment and the production of radioactive waste. The cytotoxicity of denture base resins has been the focus of many investigations, as reported in recent review of the literature.³⁵ However, although some investigations have comparatively analyzed the cytotoxicity of water-bath heat-polymerized resins to denture base polymers polymerized by light^{25,31} or microwave energy,^{23,27,29} to the authors' knowledge this is the first report that compared microwave polymerized to light-activated resins. In addition, there is no information on the cytotoxicity of Nature Cryl MC. The results from the present investigation showed that the 24-h eluates from the materials Vipi Wave, Nature Cryl MC and Eclipse, tested with or without the air barrier coating, did not reduce cellular viability compared to control.

Similar results were found when heat-polymerized (water-bath) resins were compared to microwave-polymerized resins.^{23,27,29} The effects of 24-h eluates from materials on cell viability were similar among the resins, with values >80%,²³ showing that they were slightly cytotoxic or non-cytotoxic.^{27,29} Comparison between heat-polymerized (water-bath) and light-activated acrylic resins, using the MTT assay, also demonstrated that the eluates collected from the materials at 1, 3 and 5 days produced comparable effects on human oral epithelial KB cell line, and cell viability was high than 75%.²⁵ Thus, experiments using eluates from tested materials have shown that denture base resins activated by light or microwave energy have comparable cytotoxicity to that of conventional water-bath heat-polymerized acrylic resins.

Differently from the results obtained with the eluates, a reduction on cell viability was observed in the present study, when the cytotoxicity of the materials was assessed using direct contact with the L929 cells. In addition, significant differences among materials could be detected. The biological effects of denture base polymers have been ascribed mainly to the release of unreacted free monomers.^{12,15,32,35} It is known that acrylic resins may undergo degradation caused by oxidation, decomposition and hydrolysis.^{9,14} These processes may give rise to degradation products, such as methacrylic acid (MA) via hydrolysis or esterification of the methacrylate groups,^{7,9} and benzoic acid (BA) via decomposition of benzoyl peroxide. Methacrylic acid is a physiological substrate of the valine pathway and is metabolised to CO₂ via methylmalonyl and succinyl-CoA, both being substrates of the citric acid cycle.⁸ Although MA may induce apoptosis and interferes with the cell cycle and metabolism,^{32,33} it was demonstrated that the amount of this molecule released from dental polymers reduces significantly after short period (3 hours) of water immersion.¹⁴ With regard to BA, studies have demonstrated that this compound did not promote significant changes in cell proliferation and metabolism,^{28,32} being significantly less toxic to human keratinocytes RHEK-1 than benzoyl peroxide.²² Thus, it is likely that, during the 24-h extraction period, changes or decomposition of the released residual monomers may have taken place, giving rise to by-products. This may explain, at least in part, why 24-h eluates obtained from Vipi Wave, Nature Cryl MC and Eclipse caused no significant toxic effects to the cultured L929 cells, while in the direct contact test, all materials reduced the cell viability compared with control. A recent study,³⁴ in which the metabolism of L929 cells was assessed after direct contact with three acrylic resins, it was also observed that the cell viability was significantly lower at 1-h than at 24-h or 1 week contact periods.

The percentages of cell viability after direct contact with the denture base resin Eclipse, with or without the air barrier coating, were higher than that of Nature Cryl MC. One possible explanation for this finding is the composition of the materials. Eclipse contains the dimethacrylate monomer UDMA while Nature Cryl MC is composed of the monofunctional monomer MMA. Danesh et al¹⁵ evaluated three auto- and three light-polymerized resins with regard the residual monomers remaining in the material and their elution over time. Two lightpolymerized resins based on UDMA exhibited lower elution of residual monomers than the autopolymerized ones, based on MMA. This was related to the type of the residual monomers release. Based on the fact that elution is a diffusion process, larger molecules, such as UDMA (molecular weight > than 450 g/mol),¹¹ have a lower degree of mobility through the polymeric matrix than smaller molecules, as MMA (molecular weight - 100.18 g/mol).¹⁰ In addition, for monomethacrylates, like MMA, the crosslink formation occurs at much lower concentrations than in dimethacrylate systems¹³ that forms highly cross-linked polymers, which may restrict the mobility of residual monomer molecules within the network, thus decreasing their release rate. Therefore, it can be suggested that, in the present study, less UDMA monomer was released from Eclipse compared to the MMA eluted from Nature Cryl MC. Consequently, the effects on L929 viability were lower for the former than for the latter. Moreover, the size and shape of the monomers, which is correlated to the molecular weight, play an important role in their cytotoxicity effects, as they may influence the ability of a molecule to penetrate through the cell membrane.¹¹

The denture base resin Eclipse is marketed with a coating that provides a barrier between the material's surface and atmospheric oxygen, allowing a more complete photopolymerization at the resin surface. In previous studies, it was found that the use of an air barrier coating supplied by the manufacturers of two light-activated reline resins were quite toxic, producing almost total inhibition of cell protein synthesis and inhibiting DNA and RNA synthesis.^{17,18} In addition, it was observed that, after polymerization, these coatings were difficult to be remove completely, even using scrubbing. Thus, in the present study, two types of specimens of the resin Eclipse were prepared for testing: 1) the air barrier coating was not applied, but the surfaces were covered by glass plates during polymerization to avoid contact with oxygen and the formation of an unpolymerized, air-inhibited layer on the polymerized specimens. This layer is known to produce a material that is weaker, and is capable of leaching

quantities of substances that could be cytotoxic;^{20,37} 2) the air barrier coating was applied on the specimens' surfaces during light activation and was removed after polymerization, to analyze whether any remnants of the air barrier coating left in the denture could be potentially irritating to the oral supporting tissues. The results demonstrated that the direct contact of L929 cells with the resin Eclipse resulted in similar percentages of viability, regardless whether the air barrier coating was or not present during polymerization and then removed after that.

Although *in vitro* tests with well controlled environment and known variables, as the present study, does provide valuable indications of how cell functions are affected by experimental materials, the data obtained can not be directly extrapolated to clinical situations.¹⁶ However, the authors showed in the present study that the denture base resins decreased the L929 viability when applied directly on the cells. It was also demonstrated that the higher percentage of cell viability was observed for Eclipse resin, which also presents adequate mechanical properties.³⁶ Hence, it can be suggested that this material would represent an alternative to PMMA denture base resins to minimize the risk of adverse reactions in denture patients who have sensitivity or allergy to methyl methacrylate monomer.

Conclusions

Within the limitations of this *in vitro* study, it was possible to conclude that:

- 1) For the MTT tests performed with the 24-h eluates from the materials, all denture base resins evaluated promoted high percentages of cell viability, with no significant differences among them.
- 2) After direct contact of the L929 cells and the materials for 24-h period, a significant reduction of cell viability was found compared to control, and the mean value for Nature Ceryl MC was significantly lower than the Eclipse resin, tested with or without air barrier coating. No significant differences were found when Vipi Wave was compared to the other denture base resins.

Acknowledgments

The authors thank to the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Tecnológico e Científico - CNPq (CNPq-UNESP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (grant: 2010/11764-3) for the financial support.

References

1. Çelebi N, Yüzügüllü B, Canay S, Yücel Ü. Effect of polymerization methods on the residual monomer level of acrylic resin denture base polymers. *Polym Adv Technol* 2008;19:201-6.
2. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci* 2011;19:306-12.
3. Ali A, Bates JF, Reynolds AJ, Walker DM. The burning mouth sensation related to the wearing of acrylic dentures: an investigation. *Br Dent J* 1986; 161:444-7.
4. Evrard L, Parent D. Oral allergies to dental materials: literature review and report of three cases. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 2010;49:14-8.
5. Agarwal N, Mehrotra AK. Allergy to self-polymerized acrylic resin in orthodontic patient - A case report. *JIDA* 2011;5:506-7.
6. Ruiz-Genao DP, Moreno de Vega MJ, Sanchez Perez J, Garcia-Diez A. Labial edema due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis* 2003; 48:273-4.
7. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater* 1990;6:13-6.
8. Greim H, Ahlers J, Bias R, Broecker B, Hollander H, Gelbke HP, Jacobi S, Klimisch HJ, Mangelsdorf I, Mayr W, Schon N, Stropp G, Stahnecker P, Vogel R, Weber C, Ziegler-Skylakakis K, Bayer E. Assessment of structurally related chemicals: toxicity and ecotoxicity of acrylic acid and acrylic acid alkyl esters (acrylates), methacrylic acid and methacrylic acid alkyl esters (methacrylates). *Chemosphere* 1995;31:2637-59.
9. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006;22:211-22.
10. Suzuki T, Jinno S, Hattori N, Okeya H, Ishikawa A, Deguchi M, Ohno Y, Kawai T, Noguchi T. The biological properties of a novel ethyl methacrylate resin. *J Int Med Res* 2006;34:256-63.
11. Polydorou O, König A, Hellwig E, Kümmerer K. Urethane dimethacrylate: a molecule that may cause confusion in dental research. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Oct;91(1):1-4. doi: 10.1002/jbm.b.31383.
12. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2009;2:514-8.

13. Stansbury JW. Dimethacrylate network formation and polymer property evolution as determined by the selection of monomers and curing conditions. *Dent Mater* 2012;28:13-22.
14. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Cass QB. Leachability of degradation products from hard chairside reline resins in artificial saliva: Effect of water-bath post-polymerization treatment. *J Appl Polym Sci* 2012;123:732-9.
14. Danesh G, Hellak T Reinhardt KJ, Végh A, Schäfer E, Lippold C. Elution characteristics of residual monomers in different light- and auto-curing resins. *Exp Toxicol Pathol* 2012;64:867-72.
15. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater* 2012;28:23-40.
16. Lefebvre CA, Schuster GS, Caughman GB, Caughman WF. Effects of denture base resins on oral epithelial cells. *Int J Prosthodont* 1991;4:371-6.
17. Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, Lefebvre CA. Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. *Int J Prosthodont* 1993;6:495-501.
18. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent* 1994;72:644-50.
19. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent* 1994;71:178-85.
20. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin, cytotoxicity and cell lipid metabolism. *Int J Prosthodont* 1995;8:580-6.
21. Babich H, Zuckerbraun HL, Wurzbürger BJ, Rubin YL, Borenfreund E, Blau L. Benzoyl peroxide cytotoxicity evaluated in vitro with the human keratinocyte cell line, RHEK-1. *Toxicology* 1996;106:187-96.
22. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997;10:73-7.
23. Vallittu PK, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil* 1999;26:666-71.
24. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* 2001;14:439-43.

25. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 2002;18:318-23.
26. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont* 2004;17:340-4.
27. Datar R, Rueggeberg FA, Caughman GB, Wataha JC, Lewis J, Schuster GS. Effects of subtoxic concentrations of benzoyl peroxide on cell lipid metabolism. *J Biomed Mater Res A*. 2004;71:685-92.
28. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC, Machado AL, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of storage time in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int* 2009;40:93-100.
29. Ata SO, Yavuzylmaz H. In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;91B:905-9.
30. Melilli D, Currò G, Perna AM, Cassaro A. Cytotoxicity of four types of resins used for removable denture bases: in vitro comparative analysis. *Minerva Stomatol* 2009;58:425-34.
31. Chaves CA, Machado AL, Carlos IZ, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. *Dent Mater* 2010;26:1017-23.
32. Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, Blasiak J. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep* 2012;39:1561-74.
33. Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran)* 2012;9:180-8.
34. Chaves CAL, Machado AL, Vergani CE, Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *J Prosthet Dent* 2012;107:114-27.
35. Machado AL, Puckett AD, Breeding LC, Wady AF, Vergani CE. Effect of thermocycling on the flexural and impact strength of urethane-based and high-impact denture base resins. *Gerodontology* 2012;29:e318-23.

36. Yatabe M, Seki H, Shirasu N, Sone M. Effect of the reducing agent on the oxygen-inhibited layer of the cross-linked reline material. *J Oral Rehabil* 2001;28:180-5.
37. International Standards Organization. **ISO 10993-12**: Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials. Geneva: ISO, 1999.
38. International Standards Organization. **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices – part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO, 1999.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983;65:55-63.

Table 1. Means and standard deviations (SD) of cell viability (% of controls) after L929 cells were exposed to the eluates or to direct contact with the materials.

Materials	Exposure to 24-h eluates	After direct contact with materials (24-h)
Vipi Wave	114.9 (20.7) ^A	66.3 (17.0) ^{AB}
Nature Cryl MC	114.8 (20.1) ^A	56.1 (12.8) ^A
Eclipse with ABC	108.6 (17.8) ^A	81.0 (15.4) ^B
Eclipse without ABC	113.7 (19.2) ^A	73.0 (9.9) ^B

Same superscript capital letters indicate no significant differences in columns ($P > 0.05$).

ABC – Eclipse Air Barrier Coating



Capítulo 2

3.2 Capítulo 2

Title: *Efeito de diferentes materiais reembasadores resilientes em cultura celular.*

Carolina A.L. Chaves,¹ Carlos E. Vergani,¹ Pedro Paulo Chaves de Souza,² Carlos A. S. Costa,² Ana L. Machado¹

¹ UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara, São Paulo, Brazil

² UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Ana Lucia Machado,

Rua Humaitá, 1680, Araraquara-SP, Brazil

CEP - 14801-903

Phone: +55 (16) 3301 - 6410

E-mail: cucci@foar.unesp.br; almachado98@uol.com.br

Introdução

Os materiais reembasadores resilientes são frequentemente utilizados para proporcionar melhor adaptação e conforto aos pacientes que apresentam dificuldade de utilização de próteses removíveis devido à reabsorção do rebordo alveolar, bruxismo, xerostomia e sensibilidade^{1,2}. Os reembasadores resilientes à base de resina acrílica são compostos de pó contendo poli(etil metacrilato) e líquido contendo monômero e plastificante (ésteres de ftalato)^{2,3}. Já os reembasadores à base de silicone apresentam composição similar à dos materiais de moldagem

(vinil poli siloxano)⁴. Sua resiliência constitui propriedade intrínseca do polímero e não depende da presença de plastificantes^{5,6,7}, sendo, portanto, mantida durante o período de utilização³. Outros materiais resilientes têm sido desenvolvidos especificamente como condicionadores de tecidos^{2,8,9}, sendo compostos de um pó, que consiste em poli(etil metacrilato) ou co-polímero relacionado. O líquido não contém monômero^{2,12} sendo composto por plastificantes, como ftalatos, e etanol^{10,11,16,17}. A mistura desses componentes resulta na formação de um gel que se adapta aos tecidos bucais^{2,10,11,12}.

Tem sido demonstrado que os materiais reembasadores resilientes, à base de resina acrílica ou silicone, liberam componentes residuais como monômeros, plastificantes e produtos de degradação^{13,14,15}. Os condicionadores de tecidos também liberam plastificantes e álcool^{4,8,10,16,17}. Substâncias liberadas na saliva, a partir desses materiais, podem ser transportadas para a mucosa oral e/ou do trato gastrointestinal e causar reações adversas como dor, vesículas, ulcerações, sensação de ardência e vermelhidão^{18,19,20}. Assim, estudos têm sido realizados para avaliar a biocompatibilidade dos reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos, por meio de testes que permitem verificar possíveis efeitos citotóxicos após a exposição das células às substâncias liberadas (eluatoss) por esses materiais^{11,21,22,23,24,25}. Entretanto, a literatura revela que ainda existe pouca informação sobre a citotoxicidade dos materiais resilientes indicando a necessidade de mais estudos. Além disso, apesar dos condicionadores de tecidos e dos reembasadores resilientes à base de resina plastificada apresentaram-se, em geral, mais citotóxicos, os resultados diferem entre os estudos.

A literatura consultada demonstra, ainda, que poucos estudos avaliaram os efeitos quando há o contato direto entre os materiais e as células^{26,27,28,29,30,31}. Esse aspecto é particularmente importante tendo em vista que esses materiais também têm sido amplamente utilizados em áreas de tecidos ulcerados e inflamados pela ação mecânica de próteses mal adaptadas², em próteses obturadoras após cirurgias maxilo-faciais^{32,33,34}, em casos que apresentam áreas recém operadas, regiões com lesões crônicas, trauma na mucosa bucal, bruxismo, pacientes com avitaminoses ou doenças debilitantes e em próteses imediatas ou durante o período de osseointegração de implantes³⁷.

Nos estudos sobre biocompatibilidade dos materiais reembasadores resilientes, o teste de MTT tem sido um dos mais utilizados^{11,22,23,25,27,29,31}. Esse teste relaciona-se na quantificação da atividade enzimática mitocondrial, principalmente da enzima desidrogenase succínica, e mensura

a conversão do sal de metil- tetrazolium em cristais de formazan, de cor azul escura, facilmente detectado por espectrofotometria ²². É um teste simples, sem necessidade de radioisótopo, com poucas etapas e tempo laboratorial e tem sido relacionado à quantidade de células viáveis ²². Para complementar os resultados quantitativos obtidos nos testes de viabilidade celular, análises em microscópio eletrônico de varredura (MEV) também têm sido realizadas para avaliar alterações morfológicas nas células, causadas por diferentes materiais odontológicos ^{38,39}. Outro tipo de análise que tem sido considerada importante para avaliar a citotoxicidade de materiais odontológicos é a identificação do padrão de morte celular, apoptose ou necrose ⁴⁰, por citometria de fluxo com anexina-V e iodeto de propídio. Segundo Cimpan et al. ^{41,42}, quando o material causa apoptose, os tecidos que estão em contato com a prótese terão maiores condições de se adaptar às modificações por ela induzidas. Por outro lado, quando o material causa necrose, o fenômeno inflamatório resultante desse tipo de morte celular pode induzir reações teciduais mais severas. Dessa forma, a morfologia e o padrão de morte celular constituem aspectos importantes a serem avaliados. Entretanto, apesar da citotoxicidade dos materiais reembasadores resilientes já ter sido investigada, as alterações morfológicas e os mecanismos de morte celular por eles induzidos ainda não foram elucidados.

Com base nessas considerações, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos de quatro materiais reembasadores resilientes, sendo dois à base de resina acrílica plastificada e dois à base de silicone, e 2 condicionadores de tecidos, em cultura de células (L929, HaCaT e RAW 264.7), por meio de análises da viabilidade celular (MTT), da morfologia celular (MEV) e do padrão de morte celular (citometria de fluxo). Os testes foram realizados após exposição das células a eluatos ou ao contato direto com os materiais, em períodos de 24 e 48 horas.

Materiais e Métodos

1. Preparo dos corpos de prova

Os materiais selecionados para esse estudo estão apresentados na tabela 1.

Os testes para a citotoxicidade dos materiais reembasadores resilientes foram feitos de acordo com a ISO 10993-5⁴³. Os corpos de prova de cada material (n=228) foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas previamente esterilizadas, contendo cavidades em forma de discos (10 × 1 mm)²⁴. Os materiais, proporcionados e manipulados de acordo com instruções dos fabricantes, foram inseridos nas matrizes, prensados manualmente entre duas placas de vidro

esterilizadas com duas folhas de acetato, também esterilizadas, até o término da reação. Os corpos de prova foram colocados em sacos plásticos estéreis hermeticamente fechados no banho de ultra-som por 20 minutos, sendo, em seguida, expostos à luz ultravioleta na câmara de fluxo laminar por 20 minutos para cada lado do corpo de prova com o objetivo de eliminar os possíveis microorganismos remanescentes ²⁴.

2. Preparação dos eluatos

Para a realização dos testes de citotoxicidade foram utilizados eluatos obtidos por meio da incubação dos corpos de prova em meio de cultura por dois períodos ²². Para isso, os corpos de prova de cada material (n=120) foram divididos, aleatoriamente, nos 2 períodos de incubação estabelecidos, de 24 e 48 horas (n=5). A seguir, foram colocados, individualmente, em uma placa de 24 compartimentos, contendo 3 ml de meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM) e incubados a 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de ar por 24 horas ou 48 horas. Meio de cultura, sem corpos de prova, também foi incubado nas mesmas condições e serviu como controle.

3. Cultura celular

Neste estudo foram utilizadas três linhagens de células imortalizadas, sendo fibroblastos L929, queratinócitos humanos (HaCaT – CLS 300493) e macrófagos RAW 264.7, cultivadas no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Brasil. As três linhagens foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL e 100 mg/mL de penicilina e estreptomicina, respectivamente, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, na temperatura de 37 °C. As células foram subcultivadas a cada 3 dias até se obter número adequado de células, quando então, foram semeadas em placas de cultura estéreis.

4. Análise do metabolismo celular

Após atingir aproximadamente 80% de densidade, as células foram tripsinizadas e colocadas em placas estéreis de 96 compartimentos (1×10^4 cells/mL) e incubadas por 24 horas. Anteriormente ao início dos testes, os eluatos obtidos de cada material nos períodos de 24 ou 48 horas (n=10) foram colocados em contato com as células por 24 horas em incubadora, na temperatura de 37° C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Nas mesmas condições experimentais,

compartimentos da placa contendo células e meio de cultura sem eluato foram utilizados como controle.

O efeito dos reembasadores resilientes sobre o metabolismo celular foi também avaliado após o contato direto das células com os materiais. Para isso, os corpos de prova de cada material (n=72) foram colocados em placas de cultura de 24 compartimentos e, em seguida, as células foram semeadas (1×10^5 cells/mL) sobre os materiais e incubadas em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, na temperatura de 37 °C por 24 ou 48 horas⁴³.

Para o teste de MTT, o meio de cultura foi aspirado e a solução de MTT (5 mg/ml PBS estéril) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e DMEM sem soro fetal bovino foram colocados em cada compartimento. Após a incubação das células a 37 °C por 4 horas, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04 N foi aplicada para solubilizar os cristais formados na presença de mitocôndrias ativas.

A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada em um comprimento de onda de 570 nm, utilizando-se leitor de ELISA (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader, Hercules, Califórnia, EUA). Para cada condição experimental, as médias dos valores de duas alíquotas foram calculadas para proporcionar um valor único para cada compartimento. Essas médias foram transformadas em porcentagem de viabilidade celular em relação aos controles (células em meio de cultura sem eluato ou corpo de prova), que foram considerados como 100%. Os testes foram realizados em, pelo menos, três ocasiões distintas.

5. Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia celular após exposição das células aos eluatos dos materiais por meio de MEV, lamínulas de vidro estéreis (Fisher Scientific), com 12 mm de diâmetro, foram colocadas no fundo dos compartimentos e, imediatamente após, as células foram semeadas. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e 1mL dos eluatos obtidos a partir dos materiais nos períodos de 24 ou 48 horas foi colocado em contato com as células, que foram incubadas por mais 24 horas. Meio de cultura sem eluato foi colocado em contato com as células e utilizado como controle. Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células viáveis que permanecerem aderidas na lamínula de vidro foram fixadas com 1 mL de glutaraldeído a 2,5% por 2 horas. A seguir, as lamínulas foram lavadas com PBS e água destilada, e as células foram desidratadas em soluções de etanol de concentrações ascendentes (30%, 50%, 70%, 95% e 100%) e imersas em 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazane (HMDS - Acros Organics, Springfield, NJ, USA)

por 90 minutos. As lamínulas foram, então, fixadas em stubs metálicos e colocadas em dessecador por 7 dias. As lamínulas de vidro foram cobertas com ouro e a morfologia das células aderidas foi analisada com microscópio eletrônico de varredura (FEI Inspect S50, Company, Brno, Czech Republic). Os testes foram realizados em duas ocasiões distintas.

6. Análise por citometria de fluxo com anexina-V e iodeto de propídio

A análise do tipo de morte celular pela Anexina-V baseia-se na localização da fosfatilserina. Em células viáveis, a fosfatilserina localiza-se na superfície interna da membrana citoplasmática. Quando as células entram em processo apoptótico, esse lipídeo é translocado para a superfície externa da membrana e, dessa forma, se expõe ao meio extracelular. A anexina-V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possuiu alta afinidade pela fosfatilserina. Assim, quando adicionada ao meio extracelular tende a se ligar a esse lipídeo tornando possível a identificação das células em processo de apoptose. Já o iodeto de propídio, é um marcador fluorescente de morte celular capaz de se ligar ao DNA, intercalando-se de forma não específica entre as bases. O iodeto de propídio, por ser um composto pouco lipossolúvel, só é capaz de atravessar a membrana citoplasmática quando a mesma se encontra danificada, ou seja, com o processo de morte celular por necrose iniciado. Esse teste foi realizado com as linhagens celulares L929 e HaCat, após exposição aos eluatos(n=4) obtidos dos materiais nos períodos de 24 ou 48 horas.

Os experimentos para a análise da morte celular foram realizados em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson, NJ, USA). Para cada condição experimental e controle foram coletados, pelo menos , 10.000 eventos e as populações de células L929 e HaCaT foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas através da intensidade de fluorescência dos marcadores utilizados para cada tipo de morte celular.

Após incubação das células em placas de 24 compartimentos (1×10^5 cells/mL) por 24 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com os eluatos dos materiais avaliados, obtidos nos 2 períodos de incubação estabelecidos (n=8). Células em meio de cultura sem eluato foram incubadas nas mesmas condições para servir como controle (n=8). Após esses procedimentos, as células foram tripsinizadas, removidas da placa e levadas para um tubo falcon. Em seguida, foram centrifugadas a 500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 300 μ L de tampão de ligação, contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4, composto

por 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂). Para a aquisição das células marcadas positivamente para apoptose, uma alíquota de 250 µL da suspensão celular de cada condição (experimental e controle) foi tratada com anexina-V (Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 1:500, durante 20 min, no escuro. As amostras foram adquiridas em canal de FL-1 do citômetro de fluxo. A aquisição das células marcadas positivamente para necrose foi realizada imediatamente após a adição de 0,2 µg/mL de iodeto de propídio, sendo adquiridas em canal de FL-2 do citômetro de fluxo. Os testes foram realizados em duas ocasiões distintas.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS para Windows (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Para análise dos resultados de metabolismo celular, obtidos nos testes de MTT (eluato e contato direto), e dos resultados de tipo de morte celular, obtidos na análise de citometria de fluxo com anexina-V e iodeto de propídio, foi utilizado o teste de ANOVA para dois fatores com o teste complementar de Tukey, com nível de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados

Efeito dos eluatos sobre viabilidade, morfologia e tipo de morte celular

As médias e desvios padrão das porcentagens de viabilidade celular em relação aos respectivos controles, obtidos no teste MTT, encontram-se na Tabela 2. Para as células L929 e RAW 264.7, não houve diferenças significativas entre os materiais ou entre os dois períodos de obtenção dos eluatos. Para as células HaCat, as porcentagens de viabilidade celular obtidas com os eluatos de 48 horas foram significativamente menores que as obtidas com os eluatos de 24 horas, independentemente dos materiais. As médias obtidas em todas as condições experimentais foram iguais ou maiores que 75%, com exceção das células HaCat expostas ao eluato de 48 horas dos materiais Ufi Gel P e Softone. Ainda assim, as médias de viabilidade celular foram maiores que 70%.

As Figuras 1 e 2 referem-se à fotomicrografias representativas da morfologia celular das células L929 tanto dos controles (células em meio de cultura sem eluato) como após a exposição aos eluatos dos materiais, obtidos nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente. Nas fotomicrografias dos controles (Figuras 1g e 2g), pode-se observar que as células L929 apresentaram formato alongado com delgados filamentos citoplasmáticos, recobrando o substrato

de vidro, e mitoses. Na imagens referentes às células expostas aos eluatos de 24 e 48 horas dos materiais avaliados (Figuras 1 a-f; 2 a-f), não foram observadas alterações significativas na morfologia.

Para as células HaCat, para os grupos controle (Figuras 3g e 4g), foi observado grande número de células recobrando a superfície do substrato de vidro e realizando mitoses. Pode-se observar, também, que a morfologia celular poligonal e “cobblestone”, característica dos queratinócitos, permanece inalterada. Mitoses também foram observadas quando os queratinócitos foram colocados em contato com os eluatos de 24 horas dos materiais Coe Comfort (Figura 3c), Durabase Soft (Figura 3e) e Trusoft (Figura 3f). Para as células HaCat em contato com os eluatos de 48 horas, resultados semelhantes foram observados. A morfologia celular característica dos queratinócitos foi mantida e mitoses também foram observadas após a exposição dos queratinócitos aos eluatos dos materiais Ufi Gel P (Figura 4a), Softone (Figura 4d) e Durabase Soft (Figura 4e). Nas figuras 5g e 6g, que apresentam as fotomicrografias dos controles, são observadas características normais dos macrófagos RAW 264.7: células pequenas, arredondadas, com superfície lisa, emitindo projeções filamentosas curtas e escassas. Nas figuras 5c e 5e, respectivamente, referentes ao contato das células com os eluatos de 24 horas dos materiais Coe Comfort e Durabase Soft, pode-se observar que a morfologia celular não encontra-se bem definida, com imagens que aparentam ser restos citoplasmáticos de células danificadas. Nas figuras 6b, 6c e 6e, referentes às fotomicrografias dos macrófagos RAW 264.7 após contato com os eluatos de 48 horas dos materiais Sofreliner S, Coe Comfort e Durabase Soft, pode-se observar células mal definidas e restos de citoplasma celular.

O tipo de morte celular (apoptose ou necrose) para as duas linhagens celulares (L929 e HaCat) causada pela exposição aos eluatos obtidos a partir dos materiais nos períodos de 24 ou 48 horas foi avaliado por meio de citometria de fluxo (Tabela 3). Para as células L929, foi observado que as porcentagens de morte celular por apoptose proporcionadas pelos eluatos de 24 horas dos materiais Ufi Gel P e Sofreliner S e pelo eluato de 48 horas do material Durabase Soft foram significativamente maiores que a do controle ($p= 0,021$; $p= 0,000$; $p= 0,003$, respectivamente). As porcentagens de morte por necrose das células L929 após exposição aos eluatos de 24 ou 48 horas de todos os materiais, foram maiores em relação ao controle ($p < 0,02$), com exceção do reembasador resiliente Trusoft ($p= 0,551$). Para as células HaCat, não houve

diferenças significativas entre as porcentagens de morte por apoptose ou necrose, causadas pelos eluatos de 24 ou 48 horas de todos os materiais, e os respectivos controles ($p > 0,05$).

Efeito do contato direto sobre a viabilidade celular (teste MTT)

As análises estatísticas dos resultados obtidos no teste MTT, após o contato direto das células com os materiais (Tabela 4), demonstraram que para as células L929, todos os materiais proporcionaram médias de viabilidade celular significativamente menores no período de 48 horas ($p = 0,000$). Nos dois períodos avaliados, os materiais Ufi Gel P e Sofreliner S resultaram nas maiores médias de viabilidade celular ($p < 0,001$ e $p < 0,003$, respectivamente), enquanto as menores médias foram obtidas com os materiais Durabase Soft e Coe Comfort ($p = 0,000$ e $p < 0,007$, respectivamente). O material Softone apresentou média intermediária, não tendo sido diferente do material Trusoft, no período de 48 horas ($p = 0,055$).

Resultados similares foram observados para as células HaCat, tendo sido as médias de viabilidade celular no período de 24 horas significativamente maiores que aquelas do período de 48 horas ($p = 0,006$). As maiores médias foram observadas após o contato direto das células HaCat com os materiais Ufi Gel P, Sofreliner S e Trusoft ($p < 0,002$, $p < 0,006$ e $p < 0,001$, respectivamente) e as menores médias foram obtidas para o material Durabase Soft ($p < 0,002$), independentemente do período de contato (Tabela 4). Os materiais Softone e Coe Comfort proporcionaram médias intermediárias, nos dois períodos avaliados.

Para as células RAW 264.7, houve efeito significativo somente para o fator material, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os períodos de 24 e 48 horas ($p > 0,05$). O contato direto das células RAW 264.7 com os materiais Ufi Gel P e Sofreliner S resultou nas maiores médias de viabilidade celular ($p = 0,000$). As menores médias de viabilidade celular foram obtidas para os materiais Durabase Soft, Softone e Coe Comfort ($p = 0,000$) enquanto o contato direto com o material Trusoft resultou em média intermediária e diferente das demais ($p = 0,000$).

Discussão

No presente estudo, os possíveis efeitos citotóxicos dos materiais reembasadores resilientes foram avaliados utilizando-se três linhagens celulares: L929, HaCaT e Macrófagos Raw 264.7. Os fibroblastos L929 são células de linhagem imortalizada, recomendadas pela ISO 10993-5⁴³ para testes de citotoxicidade. As células HaCaT são queratinócitos de pele humana, também de linhagem imortalizada, que são facilmente cultivadas, podendo ser utilizadas em

passagens indefinidas, e que mantêm as características biológicas dos queratinócitos humanos⁴⁴. Além disso, as células L929 e HaCat, as quais são sensíveis a monômeros e plastificantes utilizados em materiais odontológicos^{29,44,45}, têm sido comumente utilizadas para estudos de citotoxicidade de diferentes materiais incluindo resinas acrílicas e reembasadores resilientes^{11,22,24,26,42}. As células Raw 264.7, também de linhagem imortalizada, foram utilizadas porque elas retêm a maioria das funções dos macrófagos de cultura primárias⁴⁶, os quais constituem a primeira linha de defesa, protegendo o organismo contra substâncias externas e potencialmente prejudiciais, sendo sensíveis a monômeros e plastificantes que podem ser liberados por materiais poliméricos^{46,47,48}. Devido ao seu papel na patogênese da resposta inflamatória, essas células são relevantes para se testar a biocompatibilidade de materiais odontológicos⁴⁹, particularmente materiais protéticos, os quais são comumente colocados em contato com áreas de tecidos ulcerados ou em fase de cicatrização^{2,37}.

Os resultados obtidos nos testes de viabilidade celular demonstraram que, em geral, os materiais não foram citotóxicos para as células L929, Raw 264.7 e HaCat, com exceção dos eluatos de 48 horas dos materiais Ufi Gel P, Coe Comfort e Softone, os quais causaram discreta toxicidade sobre as células HaCat (valores de viabilidade celular acima de 70%). Além disso, não foram detectadas diferenças significativas entre os materiais, em nenhuma das três linhagens celulares avaliadas. Alguns estudos que avaliaram eluatos do material Ufi Gel P nos períodos de 24 hs²⁴, 48 hs¹¹ e 96 hs²², aplicados em contato com as células L929, também demonstraram a ausência de redução da viabilidade celular. Num estudo recente,²⁵ mostraram que a citotoxicidade dos reembasadores à base de silicone (GC Reline Soft e Ufi Gel P) foi menor que a dos materiais à base de resina acrílica (Lang Flexacryl, Lang Immediate, Vertex Soft e Trusoft). Além disso, para o material Ufi Gel P, as médias de viabilidade celular observadas no teste de MTT foram, em geral, menores que as do presente estudo, tendo variado de 50 a 80%. Esses resultados podem estar relacionados aos períodos mais longos para obtenção dos eluatos (até 30 dias) e, ainda, à linhagem celular (HeLa) utilizada pelos autores²⁵.

A análise de possíveis alterações na morfologia celular caracteriza uma metodologia amplamente empregada na avaliação dos efeitos tóxicos de distintos materiais e produtos usado na Odontologia. De maneira geral, a falta de redução da viabilidade de células expostas a eluatos de materiais dentários não exclui a possibilidade da ocorrência de discretos danos às delicadas estruturas celulares. Dessa forma, no presente estudo, foram feitas análises da morfologia celular

em microscópio eletrônico de varredura. As células L929 e HaCat expostas aos eluatos dos materiais experimentais apresentavam morfologia e espalhamento sobre a laminula de vidro semelhantes ao observado para o grupo controle. Por outro lado, as análises obtidas com as células RAW 264.7 evidenciaram que a morfologia celular não encontrava-se bem definida, com imagens que evidenciavam resíduos de células letalmente danificadas, sobretudo após a exposição aos eluatos dos materiais Coe Comfort e Durabase Soft. O eluato de 48 horas do material Coe Comfort também alterou as células L929, que apresentaram-se sem limite celular bem definido.

O tipo de morte celular, após exposição das células L929 e HaCat aos eluatos dos reembasadores resilientes, foi analisado por meio de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que, para as células HaCat, não houve aumento significativo nas porcentagens de apoptose e necrose para nenhum dos materiais reembasadores avaliados, tanto para os eluatos de 24 hs como de 48 hs. Para as células L929, houve aumento nas taxas de apoptose para os reembasadores Ufi Gel P e Sofreliner (eluato de 24 hs) e Durabase Soft (eluato de 48 hs) e, todos os materiais aumentaram as porcentagens de necrose (eluatos de 24 hs e 48 hs), exceção do reembasador resiliente Trusoft. A apoptose é um processo fisiológico ativo e programado de morte celular, que permite ao organismo eliminar células danificadas ou indesejadas, sem desencadear reações inflamatórias ^{41,49,52}. Por outro lado, a necrose é um processo passivo de morte celular após sua exposição à injúria severa, que ocorre de forma não controlada, sem regulação genética, induzindo processos inflamatórios com sintomas clínicos ^{41,52,53}. Tem sido sugerido que o padrão de morte celular pode ser importante em relação à evolução do potencial irritativo dos materiais odontológicos ^{41,49}, tendo em vista que as células apoptóticas, removidas por fagocitose, desencadeia discreto dano tecidual, diferente do que acontece nos casos de necrose celular ⁴⁹. Assim, embora não tenham sido verificadas alterações significativas na viabilidade celular (MTT assay), os resultados de citometria de fluxo sugerem que os efeitos dos eluatos dos materiais avaliados foram mais acentuados para as células L929 (fibroblastos) que para as células HaCat (queratinócitos). Apesar disso, os resultados sugerem que as células remanescentes ainda se apresentaram em número suficiente para produzir atividade mitocondrial (formação do formazan) similar àquela determinada para as células controle (sem contato com os eluatos), sendo isto confirmado pelo teste de viabilidade celular.

A maioria dos estudos que avaliaram a citotoxicidade dos reembasadores resilientes realizaram testes utilizando os eluatos obtidos diretamente dos materiais em teste ^{11,21-25}. Na presente pesquisa, os efeitos dos reembasadores resilientes sobre o metabolismo celular foram analisados não somente com os eluatos mas também por meio do contato direto entre as células e os materiais. Esse último experimento foi estabelecido para complementar as informações obtidas nos testes realizados com os eluatos bem como para simular os procedimentos intra-orais de reembasamento das bases das próteses, nos quais as células são colocadas em contato direto com materiais recém polimerizados, sendo assim expostas às substâncias liberadas pelos reembasadores⁵⁴. Em contraste com os resultados observados no teste dos eluatos, o contato direto entre os reembasadores resilientes e as células determinaram a ocorrência de diferenças significativas entre os materiais. Uma possível explicação para isto é que, durante os períodos de incubação das amostras em meio de cultura para obtenção dos eluatos, pode ter ocorrido a evaporação ou a decomposição das substâncias liberadas pelos materiais. Como resultado, nos testes de MTT realizados com os eluatos, não foram detectados efeitos citotóxicos severos ou diferenças significativas entre os materiais. Por outro lado, nos testes que utilizaram o contato direto entre os reembasadores e as células, a presença da amostra do material durante a realização dos testes pode ter prevenido a evaporação/decomposição dos componentes liberados ²⁸ e, conseqüentemente, maiores alterações na viabilidade celular foram observadas. Os resultados mostraram que, nos dois períodos de contato direto avaliados (24 hs e 48 hs), os materiais à base de silicone - Ufi Gel P e Sofreliner S, foram menos citotóxicos para todas as células (L929, HaCat e Raw 264.7); por outro lado, o reembasador à base de resina acrílica plastificada - Durabase Soft, apresentou efeitos mais acentuados, resultando em médias de porcentagens de viabilidade celular menores que 16%. Os condicionadores de tecidos Coe Comfort e Softone também foram citotóxicos, sobretudo para as células RAW 264.7, reduzindo a viabilidade celular para taxas menores que 8%. O material Trusoft demonstrou citotoxicidade intermediária, não tendo sido diferente estatisticamente dos reembasadores à base de silicone para as células L929 e HaCat, enquanto para as células RAW 264.7 resultou em porcentagens menores de viabilidade celular (57,4% para 24 hs e 37,7% para 48 hs). Os reembasadores resilientes à base de silicone apresentam composição similar aos materiais para moldagem à base de polivinilsiloxano². A reação desses materiais ocorre por adição, não envolvendo a formação de sub-produtos, tal como

o álcool, que se forma nos silicões que reagem por condensação, sendo que esta característica contribui para sua natureza mais estável.

Sofou et al.¹³ avaliaram a liberação de componentes dos diversos materiais reembasadores e condicionadores de tecidos em diferentes meios de armazenamento e temperaturas. Os autores mostraram que os compostos ácido metacrílico, metil metacrilato e n-butil metacrilato eluíram em níveis baixos a partir dos materiais à base de silicone, como esperado. A liberação dos plastificantes ftálicos (dialil-ftalato, butoxi carbonil metil butil ftalato, dibutil ftalato, dioctil ftalato) também ocorreu em baixos níveis, especialmente para o material Ufi Gel P. Da mesma forma, Brozek et al.¹⁵ verificaram que, embora componentes tenham sido liberados pelos materiais reembasadores resilientes avaliados, incluindo monômeros (etileno glicol dimetacrilato, metil metacrilato e dodecil metacrilato), de maneira geral, os materiais à base de silicone foram mais estáveis que aqueles à base de resina plastificada, liberando menores quantidades. Assim, pode-se sugerir que os efeitos citotóxicos menos acentuados observados no presente estudo para os materiais Ufi Gel P e Sofreliner S estejam relacionados com menor liberação de componentes residuais.

O reembasador à base de resina acrílica plastificada Durabase Soft é composto por um pó à base de polietil metacrilato (PEMA) e peróxido de benzoíla (PB), uma molécula que atua como gerador de radicais livres e é utilizada como iniciador da reação de polimerização de materiais poliméricos^{55,56}. Os radicais livres, entre eles as espécies reativas de oxigênio (EROS), são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados, o que faz com que essas moléculas sejam instáveis e apresentem, como uma de suas características, a meia vida curta e alta interação com todas as moléculas biológicas (lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos), podendo causar injúrias às células⁵⁷. Os radicais livres gerados pela decomposição do PB durante a reação de polimerização levam ao estresse e colocam as células sob condições tóxicas⁵⁸, sendo que células expostas aos materiais poliméricos também produzem radicais livres⁵⁸. Assim, provavelmente, o efeito tóxico do PB é mediado pelos seus radicais livres derivativos, cuja formação envolve a quebra da ligação peróxido na molécula do PB para formar tanto radicais benzoiloxil, que podem se fragmentar para formar dióxido de carbono e radicais fenílicos, como o produto final e estável da degradação, que é o ácido benzóico (AB)^{55,56}. Estudos têm demonstrado que o peróxido de benzoíla pode influir no metabolismo de lipídeos e afetar a viabilidade⁵⁶, o crescimento e a proliferação celular, com danos irreversíveis dependendo

da concentração, e ainda, o aumento na multinucleação e intensa vacuolização das células ⁵⁵. Além disso, Babich et al. ⁵⁵ verificou que o PB foi aproximadamente 10 vezes mais tóxico que o peróxido de hidrogênio, e cerca de 250 vezes mais tóxico que o produto final AB. Assim, é provável que esses efeitos negativos do PB tenham contribuído, de maneira decisiva, para a atividade tóxica do reembasador Durabase Soft sobre as 3 linhagens celulares avaliadas no presente estudo.

O líquido do material Durabase Soft é composto por metil metacrilato (MMA) e o plastificante di-butil ftalato (DBP) os quais são liberados para a cavidade oral. Conforme relatado anteriormente, os reembasadores resilientes à base de resina plastificada liberam mais produtos e em maior quantidade que os materiais à base de silicone, entre eles monômeros residuais e plastificantes ftalatos ¹³⁻¹⁵. Embora os processos relacionados à toxicidade dos monômeros ainda não estejam completamente elucidados, alguns mecanismos tem sido relatados na literatura, como danos ao DNA ⁵⁸, lesão na dupla camada lipídica das células ⁵⁹, e alteração na mobilização dos íons cálcio (Ca^{2+}), os quais atuam como mensageiros secundários e apresentam papel importante em muitos “pathways” de transdução de sinais celulares ⁵⁹. Para monômeros hidrofóbicos, como o MMA, foi verificado que o aumento na concentração intracelular de cálcio livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ocorreu de forma dose-dependente. O aumento do ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) também foi relacionado com os valores de $\log P$ ⁵⁹, que é o coeficiente de partição octanol-água, indicativo da hidrofobicidade ou lipofilicidade da substância ^{59,60}. Tem sido observado que, dependendo da lipofilicidade ($\log P$) dos monômeros, eles se localizam, predominantemente, nas membranas celulares dos tecidos orais ⁶¹. Outro mecanismo proposto para a citotoxicidade dos materiais poliméricos é o estresse oxidativo causado a partir do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e o sistema de defesa antioxidante (redox)^{54,58}. As EROS geradas pelos materiais resinosos, representadas pelo peróxido de hidrogênio, ânions superóxidos e radicais hidroxilas, são conhecidas por reduzir os níveis intracelulares de moléculas antioxidantes como a glutathiona, um removedor direto de EROS ^{58,62}. Os ésteres α,β -insaturados, utilizados como monômeros em resinas, entre eles o MMA, podem apresentar toxicidade através da reação com nucleófilos intracelulares, como a glutathiona reduzida, via adição de Michael⁶¹. Essa reação envolve a adição de um nucleófilo, denominado doador de Michael, a um eletrófilo (α,β -insaturado), denominado acceptor de Michael. O aumento nas EROS, após a depleção da glutathiona, resulta em estresse oxidativo que pode levar a danos no DNA, atraso no ciclo celular

e, eventualmente, morte celular, principalmente na forma de apoptose^{58,62}. De qualquer forma, podemos supor que a presença do MMA na composição do reembasador resiliente Durabase Soft tenha contribuído, pelo menos em parte, para os efeitos citotóxicos observados no presente estudo. Além disso, o MMA pode se decompor, via hidrólise, em ácido metacrílico (AM)⁶³, o qual também apresenta efeito citotóxico⁶⁴, alterando tanto o metabolismo celular como a síntese de DNA⁶⁵. Devido à sua estrutura alílica, o AM pode formar moléculas altamente reativas (epóxidos) que podem contribuir para os efeitos citotóxicos⁶⁶.

Além do monômero MMA, o líquido do reembasador resiliente Durabase Soft também contém o plastificante DBP. Os ftalatos e outros ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos têm sido utilizados como agentes “softening” para obter plasticidade dos materiais odontológicos, com aplicação típica nos reembasadores resilientes. No presente estudo, outros materiais avaliados também contêm plastificantes, como o DBP no condicionador de tecidos Softone, o benzil butil ftalato (BBP) no reembasador Trusoft e o benzil benzoato (BB), um plastificante “phtalate ester-free”, presente no condicionador de tecidos Coe Comfort⁶⁷. Resultados similares foram observados em células L929 após exposição ao DBP por 24 hs⁶⁵, e em macrófagos murinos RAW 264.7 expostos por 60 min aos plastificantes BBP e DBP⁴⁷. A toxicidade dos ésteres de ftalatos tem sido relacionada com o seu metabólito ácido metoxiacético que causa geração de EROS e consequente danos ao DNA e à mitocôndria de fibroblastos humanos. Além disso, foi sugerido que o plastificante BB pode causar danos oxidativos tanto às membranas como às proteínas celulares (Longjuan et al., 2010). O BB é um composto solúvel em gordura (fat-soluble), que pode penetrar nas células através da membrana celular e, então, atuar na mitocôndria, aumentando a permeabilidade, alterando o canal de transporte, inibindo a respiração mitocondrial e produzindo mais espécies reativas. As EROS produzidas podem atacar os ácidos graxos poli-insaturados, induzir peroxidação lipídica e, assim, produzir os peróxidos lipídicos como o malondialdeído, cujo conteúdo reflete a severidade dos radicais livres que atacam, indiretamente, as células do organismo⁶⁸. Assim, é provável que os efeitos citotóxicos observados neste estudo para os materiais Durabase Soft, Softone e Coe Comfort e, em menor extensão, para o material Trusoft, estejam relacionados, pelo menos em parte, à presença dos plastificantes DBP, BB e BBP nas suas composições. Efeitos citotóxicos, como zona de inibição do crescimento, lise celular²⁶ e redução da viabilidade celular²⁹, quando em contato direto entre condicionadores de tecidos, entre eles o Coe Comfort, foram observados em contato direto com

diferentes células. Por outro lado, Kostic et al.³¹, ao avaliarem os materiais à base de resina plastificada Trusoft, Lang Flexacryl e Lang Immediate em contato com células HeLa por 24 hs, obtiveram média de viabilidade celular de 78,7% no teste de MTT para o material Trusoft. Essa média foi maior que as observadas no presente estudo para o período de contato de 24 hs entre esse material e as células HaCat e RAW 264.7, e menor que a verificada para as células L929. As diferentes linhagens celulares utilizadas podem ter contribuído para essas diferenças entre os resultados, tendo em vista que, no presente estudo foi possível observar que, em geral, os efeitos do contato direto dos materiais avaliados foram mais acentuados sobre as células HaCat e RAW 264.7. Lefebvre et al.²⁷ observaram que o material reembasador resiliente à base de resina acrílica plastificada (Permasoft) não causou efeito na viabilidade celular avaliada pelo teste MTT quando em contato direto com células Balb/c. Entretanto, estes autores também avaliaram o efeito do material quanto à adesão de *Candida albicans* e, em função disso, as amostras foram imersas em saliva artificial estéril por 5 dias para permitir a liberação de ftalatos, os quais, por apresentarem efeitos citotóxicos, poderiam interferir nos resultados. Isto poderia explicar, mesmo que parcialmente, as diferenças entre os resultados de Lefebvre et al.²⁷ e os dados apresentados no presente estudo. Deve-se ressaltar, ainda, que o tipo de material e célula utilizados nestes estudos, bem como ao tempo decorrido entre o preparo das amostras e a realização dos testes, também podem ter influenciado os diferentes dados apresentados neste estudo.

Para materiais resilientes à base de PEMA, como os utilizados no presente estudo, o álcool é necessário para promover aumento de volume das partículas do polímero (swelling) e facilitar sua dissolução no plastificante, produzindo, assim, um tempo de geleificação clinicamente aceitável (ou adequado)⁶⁹. Desta forma, os materiais Trusoft, Softone e Coe Comfort contêm etanol nas suas composições. Para o primeiro, a concentração de etanol é maior que 50%, sendo que para os demais, esta informação não está disponibilizada. Tem sido relatado que o álcool é liberado a partir dos condicionadores de tecidos^{8,69}, e que a maior liberação ocorre nas primeiras 12 ou 24 hs¹². As substâncias liberadas na saliva, a partir desses materiais, tem sido relacionadas com reações adversas nos tecidos orais^{18,19,20}. Entretanto, os resultados do presente estudo demonstraram que, apesar da concentração relativamente alta de etanol, o Trusoft foi, em geral, menos tóxico para as 3 linhagens celulares avaliadas que os materiais Softone e Coe Comfort, nos dois períodos de contato direto estudados (24 e 48 hs). No estudo de Babich e Borenfreund⁶⁰, os efeitos citotóxicos de vários álcoois foram avaliados, em diferentes linhagens

celulares (fibroblastos Balb/c 3T3, macrófagos RAW 264.7, células de Hamster CH V79). Os autores observaram que os efeitos foram relacionados com a lipofilicidade das substâncias testadas, caracterizada pelos valores de $\log P$. Para os álcoois com valores de $\log P$ negativos, isto é mais hidrofílicos e menos lipofílicos, como o etanol ($\log P = -0,26$), as doses para causar redução de 10% na viabilidade celular (NR_{90}) foram maiores (de 428,2 a 513 mM) do que aquelas observadas para álcoois mais lipofílicos, como o 1-octanol ($\log P = 3,15$) que variaram de 5,1 a 9,6 mM. Dessa forma, podemos supor que a presença do etanol na composição do Trusoft, Softone e Coe Comfort, independentemente da concentração, não tenha contribuído, de maneira significativa, para as diferenças nos efeitos citotóxicos observadas entre os três materiais. Por outro lado, um fator que pode ter contribuído diretamente para essas diferenças, seria o peso molecular dos plastificantes utilizados em cada um dos materiais. O DBP, presente no material Softone, e o BB, presente no Coe Comfort, possuem pesos moleculares de 278,34^{47,69} e 212,25⁶⁹, respectivamente, enquanto o BBP, que faz parte da composição do Trusoft, apresenta maior peso molecular (312,36)⁴⁷. Tem sido relatado que os plastificantes com maior peso molecular apresentam menor liberação dos materiais resilientes⁶⁹. No estudo de Hong et al.⁶⁹, foi verificado que o material Coe Comfort apresentou liberação do plastificante BB em quantidades significativamente maiores que aquelas liberadas por outros materiais que continham plastificantes BBP e DBP, nos dois períodos de 1 e 14 dias. Assim, podemos supor que os efeitos mais acentuados observados neste estudo, para o contato direto entre as células e o condicionador de tecidos Coe Comfort, estejam relacionados com o menor peso molecular do BB em relação aos plastificantes DBP e BBP.

O presente estudo demonstrou que, com exceção dos reembasadores resilientes à base de silicone, o contato direto entre as células L929, HaCat e RAW 264.7 e os materiais à base de resina acrílica plastificada e os condicionadores de tecidos causaram efeitos citotóxicos definidos. Embora os resultados com cultura de células não possam ser diretamente extrapolados para situações clínicas, é importante considerar se as alterações aqui observadas poderiam ter efeito cumulativo e tornarem-se mais acentuadas após período mais extenso de exposição. Isso poderia tornar as células mais susceptíveis a injúrias subsequentes, como por exemplo, o contato direto com materiais reembasadores recém aplicados sobre os tecidos. É importante ressaltar, ainda que devido à perda de plastificantes e álcool, os materiais reembasadores resilientes precisam ser substituídos periodicamente, alguns em intervalos de tempo relativamente curtos, para prevenir

trauma e colonização por microrganismos. Essa substituição, apesar de prevenir traumas e a colonização do material por microrganismos, aumenta à exposição dos tecidos às substâncias liberadas por esses materiais que, mesmo em baixas concentrações, podem levar a efeitos negativos crônicos sobre as células da mucosa oral. Ainda que não ocorra citotoxicidade aguda, a liberação contínua e persistente dessas substâncias pode comprometer, significativamente, a homeostase dos tecidos e o reparo, aspecto particularmente importante considerando-se que alguns desses materiais são aplicados sobre áreas recém operadas e em processo de cicatrização. Com base nos resultados do presente estudo, os materiais à base de silicone parecem ser os mais recomendados quando se considera o fator biocompatibilidade.

Conclusões

- 1) Não foi verificado efeito citotóxico para os eluatos dos materiais avaliados, obtidos com 24 e 48 horas, em nenhuma das células testadas.
- 2) Os fibroblastos e queratinócitos apresentaram diferentes sensibilidades quando em contato com os eluatos dos materiais testados, de 24 e 48 horas. Sendo que, os fibroblastos apresentaram maiores taxas de necrose celular para ambos os períodos de eluatos.
- 3) Os materiais a base de silicone, Ufi Gel P e Sofreliner S, testados no presente estudo, apresentaram menor redução na viabilidade celular, quando em contato direto com as diferentes linhagens celulares testadas, nos períodos de 24 e 48 horas.

Referências Bibliográficas

1. Mack, PJ. Denture soft lining materials: clinical indications. *Austr Dent J.* 1989; 34(5): 454-8.
2. Murata H, Hamada T, Sadamori S. Relationship between viscoelastic properties of soft denture liners and clinical efficacy. *Jpn Dent Sci Rev.* 2008; 44: 128-32.
3. Garcia LT, Jones JD. Soft liners. *Dent Clin N Am.* 2004; 48(3): 709–20.
4. Cazacu M, Racles C, Vlad A, Antohe M, Forna N. Silicone-based composite for relining of removable dental prosthesis. *J Compos Mater.* 2009; 43(19): 2045-55.
5. McCabe JF. Soft lining materials: composition and structure. *J Oral Rehabil.* 1976; 3(3): 273-8.

6. Cha HS, Yu B, Lee YK. Changes in stress relaxation property and softness of soft denture lining materials after cyclic loading. *Dent Mater.* 2011; 27(3): 291-7.
7. Niarchou A, Ntala P, Pantopoulos A, Polyzois G, Frangou M. Effect of immersion cleansing in color stability and hardness of soft denture reliners. *J Craniofac Surg.* 2012; 23(2): 426-29.
8. Murata H, Narasaki Y, Hamada Taizo, McCabe JF. An alcohol-free tissue conditioner—A laboratory evaluation. *J Dent.* 2006; 34(4): 307–15.
9. Saitoh S, Sasaki K, Nezu T, Taira M. Viscoelastic behavior of commercially available tissue conditioners under compression. *Dent Mat J.* 2010; 29(4): 461-68.
10. Graham BS, Jones DW, Sutow EJ. An in vivo and in vitro study of the loss of plasticizer from soft polymer gel materials. *J Dent Res.* 1991; 70(5): 870-3.
11. Park SK, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Changes in properties of short-term-use soft liners after thermocycling. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(7): 717-24.
12. Hong G, Maeda T, Li Y, Sadamori S, Hamada T, Murata H. Effect of PMMA polymer on the dynamic viscoelasticity and plasticizer leachability of PEMA-based tissue conditioners. *Dent Mater J.* 2010; 29(4): 374-80.
13. Sofou A, Tsoupi I, Karayannis M, Owall B. Determination of residual monomers released from soft lining materials with the use of HPLC. *Pak J Anal Environ Chem.* 2007; 8(1): 41-52.
14. Brozek R, Rogalewicz R, Koczorowski R, Voelkel A. The influence of denture cleansers on the release of organic compounds from soft lining materials. *J Environ Monit.* 2008; 10(6): 770-4.
15. Brożek R, Koczorowski R, Rogalewicz R, Voelkel A, Czarnecka B, Nicholson JW. Effect of denture cleansers on chemical and mechanical behavior of selected soft lining materials. *Dent Mater.* 2011; 27(3): 281-90.
16. Munksgaard EC. Leaching of plasticizers from temporary denture soft lining materials. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(1): 101-4.
17. Munksgaard EC. Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(2): 166-9.
18. Zaki HS, Ketzan KJ, Carrau RL. Hypersensitivity to temporary soft denture liners: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 1995; 73(1): 1-3.

19. Mutluay MM, Oguz S, Fløystrand F, Saxegaard E, Dogan A, Bek B, et al. A prospective study on the clinical performance of polysiloxane soft liners: one-year results. *Dent Mater J*. 2008; 27(3): 440-7.
20. Marín Zuluaga DJ, Gómez Velandia OC, Rueda Clauijo DM. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. *Gerodontology*. 2011; 28(4): 258-63.
21. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*. 2006; 23(1): 17-22.
22. Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90(1): 82-6.
23. Kanie T, Tomita K, Tokuda M, Arikawa H, Fujii K, Ban S. Mechanical properties and cytotoxicity of experimental soft lining materials based on urethane acrylate oligomers. *Dent Mater J*. 2009; 28(4): 501-6.
24. Tay L, Herrera DR, Quishida CCC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology* 2012; 29(2): e275–e80.
25. . In vitro ispitivanje potencijalne toksičnosti oralno tkivnih kondicionera. *Hem Ind*. 2011; 65(6): 697-706.
26. Okita N, Hensten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. *J Prosthet Dent*. 1991; 66(5): 656-9.
27. Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent*. 2001; 85(4): 352-6.
28. Abe Y, Ueshige M, Takeuchi M, Ishii M, Akagawa Y. Cytotoxicity of antimicrobial tissue conditioners containing silver-zeolite. *Int J Prosthodont*. 2003; 16(2): 141-4.
29. Hashimoto Y, Tanaka J, Suzuki K, Nakamura M. Cytocompatibility of a tissue conditioner containing vinyl ester as a plasticizer. *Dent Mater J*. 2007; 26(6): 785-91.
30. Tukay A, Bayindir F, Akyil MS. Cytotoxicity of soft and hard denture lining materials on MA-104, Vero and primary tooth cell culture. *Mat Res Innov*. 2010; 14(3): 220-3.
31. Kostić M, Najman S, Najdanović J, Krunic N, Kostić I. Application of direct contact test in evaluation of cytotoxicity of acrylic denture base resins. *Acta Medica Medianae*. 2012; 51(1): 66-72.

32. Ortegon SM, Martin JW, Lewin JS. A hollow delayed surgical obturator for a bilateral subtotal maxillectomy patient: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 2008; 99(1): 14-8.
33. Patil PG. Conventional complete denture for a left segmental mandibulectomy patient: A clinical report. *J Prosthodont Res.* 2010; 54(4): 192-7.
34. Bilhan H, Geckili O, Bural C, Sonmez E, Guven E. Prosthetic rehabilitation of a patient after surgical reconstruction of the maxilla: a clinical report. *J Prosthodont.* 2011; 20(1): 74-8.
35. Gonzalez JB. Use of tissue conditioners and resilient liners. *Dent Clin North Am.* 1977; 21(2): 149-59.
36. Sadig W, Almas K. Risk factors and management of dehiscant wounds in implant dentistry. *Implant Dent.* 2004; 13(2): 140-6.
37. Dos Santos MB, Consani RL, Mesquita MF. Influence of different soft liners on stress distribution in peri-implant bone tissue during healing period. A 3-D finite element analysis. *J Oral Implantol.* 2011 Jul 18. [Epub ahead of print]
38. de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, Sacramento PA, et al. Mechanical and biological characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(2): 131-8.
39. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdentinal diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(6): 533-43.
40. Moharamzadeh K, Brookand IA, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials.* 2009; 2(2): 514-48.
41. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjersten BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(1): 59-69(a).
42. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, et al. The effect of heat- and auto- polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand.* 2000; 58(5): 217-28(b).
43. International Standards Organization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO; 1999.
44. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater.* 2007; 23(1): 40-4.

45. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater.* 2002; 18: 318-23.
46. Bailey LO, Weir MD, Washburn NR. Quantification of macrophage viability and inflammatory response to dental bonding resins. *J Bioact Compat Polym.* 2006; 21(3): 185-206.
47. Naarala J, Korpi A. Cell death and production of reactive oxygen species by murine macrophages after short term exposure to phthalates. *Toxicol Lett.* 2009; 188(2): 157-60.
48. Lin NJ, Bailey LAO, Becker ML, Washburn N R, Henderson LA. Macrophage response to methacrylate conversion using a gradient approach. *Acta Biomaterialia.* 2007; 3: 163-73.
49. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater.* 2006; 22(7): 630-40.
50. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12): 958-69.
51. Vervaeke S, Dierens M, Besseler J, De Bruyn H. The Influence of Initial Soft Tissue Thickness on Peri-Implant Bone Remodeling. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 [Epub ahead of print]
52. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006; 85(10): 870-7.
53. Gough JE, Downes S. Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J Biomed Mater Res.* 2001; 57(4): 497-505.
54. Att W, Yamada M, Kojima N, Ogawa T. N-Acetyl cysteine prevents suppression of oral fibroblast function on poly(methylmethacrylate) resin. *Acta Biomater.* 2009; 5(1): 391-8.
55. Babich H, Zuckerbraun HL, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Borenfreund E, Blau L. Benzoyl peroxide cytotoxicity evaluated in vitro with the human keratinocyte cell line, RHEK-1. *Toxicology.* 1996; 106(1-3): 187-96.
56. Datar R, Rueggeberg FA, Caughman GB, Wataha JC, Lewis J, Schuster GS. Effects of subtoxic concentrations of benzoyl peroxide on cell lipid metabolism. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 71(4): 685-92.

57. Moreau MF, Chappard D, Lesourd M, Monthéard JP, Baslé MF. Free radicals and side products released during methylmethacrylate polymerization are cytotoxic for osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res.* 1998; 40(1): 124-31.
58. Aita H, Tsukimura N, Yamada M, Hori N, Kubo K, Sato N, et al. N-acetyl cysteine prevents polymethyl methacrylate bone cement extract-induced cell death and functional suppression of rat primary osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 92(1): 285-96.
59. Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. (Meth)acrylate monomer-induced cytotoxicity and intracellular Ca(2+) mobilization in human salivary gland carcinoma cells and human gingival fibroblast cells related to monomer hydrophobicity. *Biomaterials.* 2006; 27(34): 5794-800.
60. Babich H, Borenfreund E. Structure-activity relationship (SAR) models established in vitro with the neutral red cytotoxicity assay. *Toxicol In Vitro.* 1987; 1(1): 3-9.
61. Fujisawa S, Kadoma Y. Prediction of the reduced glutathione (GSH) reactivity of dental methacrylate monomers using NMR spectra - Relationship between toxicity and GSH reactivity. *Dent Mater J.* 2009; 28(6): 722-9.
62. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Effects of resinous monomers on the odontogenic differentiation and mineralization potential of highly proliferative and clonogenic cultured apical papilla stem cells. *Dent Mater.* 2012; 28(3): 327-39.
63. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Cass QB. Leachability of degradation products from hard chairside reline resins in artificial saliva: Effect of water-bath post-polymerization treatment. *J Appl Pol Sci.* 2012; 123(2): 732-9.
64. Kurata S, Morishita K, Kawase T, Umemoto K. Cytotoxic effects of acrylic acid, methacrylic acid, their corresponding saturated carboxylic acids, HEMA, and hydroquinone on fibroblasts derived from human pulp. *Dent Mater J.* 2012; 31(2): 219-25.
65. Chaves CA, Machado AL, Carlos IZ, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. *Dent Mater.* 2010; 26(10): 1017-23.
66. Emmeler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of dental composite TEGMA and selected metabolic by-products in human pulmonar cells. *Dent Mater* 2008; 24(12): 1670-5.
67. Hashimoto Y, Nakamura M. Cytocompatibility and viscoelastic properties of phthalate ester-free tissue conditioners. *Dent Mater J.* 2004; 23(3): 412-8.

68. Longjuan Q, Fengyun C, Xu Y, Qin L. Study on oxidative damage and genotoxicity of butyl benzyl phthalate on the hepatic cells of rat. IEEE, 2010.
http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5515275&tag=1
69. Hong G, Maeda T, Murata H, Sasaki K. The dynamic viscoelasticity and plasticizer leachability of tissue conditioners. Gerodontology. 2012; 29(4): 284-91.

Tabela 1. Materiais avaliados neste estudo.

Material	Tipo	Fabricante	Proporção pó/liquid	Composição	Numero do Lot.	Tempo de polimerização/geleificação em temperature ambiente
Durabase Soft	Reembasador a base de resina plastificada	Reliance MFG Co., USA	Dental III., 1g/0.83 mL	Pó – PEMA e peróxido de benzoila Liquido – MMA e DBP	29549	15 min
Trusoft	Reembasador a base de resina plastificada	Bosworth Co, Skokie, IL,USA	1.06g/1.15mL	Pó – PEMA Liquido – Butil Benzil ftalato (plastificante) e álcool etílico	0904- 137	6 min
Ufi Gel P	Reembasador a base de silicone	Voco, Germany	Cuxhaven, Base e catalisador em proporção de 1:1	Base-polidimethylsiloxane(A- silicone) Catalisador- catalisador de platina	1009051	10 min
Sofreliner S	Reembasador a base de silicone	Tokuyama Corp., Japan	Dental Tokyo, Sistema de auto-dispensa	Polyorganosiloxane Silicone resin poder Silica, amorphous	035E50	5 min
Softone	Condicionador de tecido	Bosworth Co, Skokie, IL, USA	1.03g/1.1mL	Pó – PEMA Liquido – DPB e alcooll	0906- 231	8 min
Coe Comfort	Condicionador de tecido	GC America Inc, Alsip, IL, USA	1g/0.83 mL	Pó – PEMA e zinco undecilenato Liquido – Benzil benzoato, óleo de semente de algodão, etanol, acetil tributil citrato, salicilato de metila, e óleo de hortelã-pimenta	1006032	10 min

PEMA, poly (etil metacrilato); MMA, metil metacrilato; DBP, DBP, di-butil ftalato.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão (DP) da viabilidade celular (% do controle) após a exposição das células a 24 ou 48 horas dos eluatos dos materiais.

Material	Linhagem celular					
	L929		HaCat		RAW 264.7	
	Periodo do eluato		Periodo do eluato		Periodo do eluato	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Durabase Soft	78.9 (27.6)	94.5 (18.8)	98.1 (10.6)	88.4 (8.1) *	90.1 (27.9)	85.8 (10.7)
Trusoft	84.8 (33.2)	110.5 (17.1)	109.5 (4.2)	81.0 (7.5) *	104.4 (7.7)	94.7 (18.2)
Ufi Gel P	107.5 (13.1)	118.8 (14.0)	89.2 (19.6)	72.0 (14.4) *	99.9 (8.6)	103.5 (8.5)
Sofreliner S	105.6 (5.9)	110.4 (9.7)	91.8 (7.1)	83.0 (15.5) *	92.2 (9.3)	95.6 (28.2)
Softone	88.3 (7.5)	89.4 (13.0)	84.6 (21.8)	71.8 (25.3) *	85.8 (20.4)	82.6 (15.7)
Coe Comfort	100.8 (9.7)	108.1 (13.1)	81.6 (22.9)	75.2 (32.9) *	85.0 (10.8)	88.2 (16.3)

* - Houve diferença significativa entre os dois períodos (24 - e 48-horas dos eluatos).

Tabela 3. Médias geométricas e desvios padrão (DP) da porcentagem de apoptose e necrose, após exposição das células L929 e HaCat aos eluatos dos materiais de 24 ou 48 hs.

Período do eluato	Material	Linhagem celular			
		L929		HaCat	
		Apoptose (%)	Necrose (%)	Apoptose (%)	Necrose (%)
24 hs	Durabase Soft	3.41 (2.31) ^{ab}	20.42 (1.39) ^b	7.94 (1.58) ^a	2.54 (2.24) ^{cd}
	Trusoft	2.89 (2.02) ^{ab}	12.52 (1.72) ^{ab}	8.59 (1.83) ^a	2.42 (2.16) ^{cd}
	Ufi Gel P	12.73 (2.24) ^{bc}	18.44 (1.45) ^b	5.94 (1.58) ^a	3.32 (2.46) ^{cd}
	Sofreliner S	25.08 (2.17) ^c	22.51 (1.41) ^b	5.68 (1.31) ^a	2.03 (1.18) ^{cd}
	Softone	2.31 (1.98) ^a	24.78 (1.47) ^b	4.76 (1.29) ^a	1.72 (2.04) ^c
	Coe Comfort	1.30 (3.70) ^a	14.85 (1.79) ^b	7.11 (1.36) ^a	4.32 (1.33) ^d
	Controle	2.39 (2.35) ^a	6.88 (1.91) ^a	7.17 (1.33) ^a	2.03 (2.35) ^{cd}
48 hs	Durabase Soft	12.15 (3.08) ^{bc}	17.91 (1.71) ^b	6.96 (2.07) ^b	1.17 (1.85) ^{ab}
	Trusoft	1.96 (2.54) ^a	10.74 (1.82) ^{ab}	12.02 (2.48) ^b	1.48 (1.65) ^{ab}
	Ufi Gel P	2.91 (2.52) ^{ab}	13.44 (1.87) ^b	8.70 (2.33) ^b	2.31 (1.80) ^{ab}
	Sofreliner S	2.43 (3.25) ^a	13.83 (1.70) ^b	6.53 (1.98) ^b	1.99 (1.58) ^{ab}
	Softone	2.41 (1.64) ^a	15.09 (1.70) ^b	8.09 (2.25) ^b	1.24 (1.79) ^a
	Coe Comfort	4.31 (1.95) ^{ab}	16.04 (2.15) ^b	12.73 (1.51) ^b	2.34 (2.40) ^b
	Controle	1.72 (2.47) ^a	10.05 (1.32) ^a	8.20 (1.82) ^b	1.59 (1.90) ^{ab}

Para cada linhagem celular, as mesmas letras não indicam diferenças significativas em colunas ($P > 0.05$).

Tabela 4. Médias e desvio-padrões (DP) da viabilidade celular (% controle) depois do contato direto dos materiais por 24 ou 48 hs com as células L929, HaCat e RAW 264.7.

Material	Linhagem celular					
	L929		HaCat		RAW 264.7	
	Período do eluato		Período do eluato		Período do eluato	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Durabase	15.8 (3.9) ^{Aa}	13.9 (8.0) ^{Ba}	8.2 (6.0) ^{Aa}	1.7 (1.5) ^{Ba}	5.8 (4.4) ^{Aa}	5.4 (8.7) ^{Aa}
Soft						
Trusoft	97.9 (17.7) ^{Ac}	51.2 (8.4) ^{Bbc}	65.2 (20.1) ^{Acd}	61.3 (25.4) ^{Bcd}	57.4 (17.0) ^{Ab}	37.7 (19.0) ^{Ab}
Ufi Gel P	99.3 (14.6) ^{Ac}	71.6 (12.4) ^{Bc}	89.0 (24.1) ^{Ad}	69.7 (4.9) ^{Bd}	84.0 (6.9) ^{Ac}	106.2 (10.0) ^{Ac}
Sofreliner S	91.4 (7.9) ^{Ac}	73.9 (3.7) ^{Bc}	86.6 (15.3) ^{Ad}	63.6 (8.3) ^{Bd}	89.2 (11.5) ^{Ac}	97.2 (17.0) ^{Ac}
Softone	60.6 (15.4) ^{Ab}	46.1 (21.8) ^{Bb}	44.1 (26.7) ^{Abc}	39.3 (20.9) ^{Bbc}	16.3 (8.9) ^{Aa}	15.3 (18.6) ^{Aa}
Coe	31.2 (19.8) ^{Aa}	21.8 (21.0) ^{Ba}	37.0 (21.7) ^{Aab}	6.4 (4.2) ^{Bab}	7.9 (8.1) ^{Aa}	4.8 (6.2) ^{Aa}
Comfort						

Para cada linhagem celular, letras maiúsculas iguais indicam diferenças significativas nas linhas, e as mesmas pequenas letras na coluna indicam diferenças significativas ($P > 0.05$).

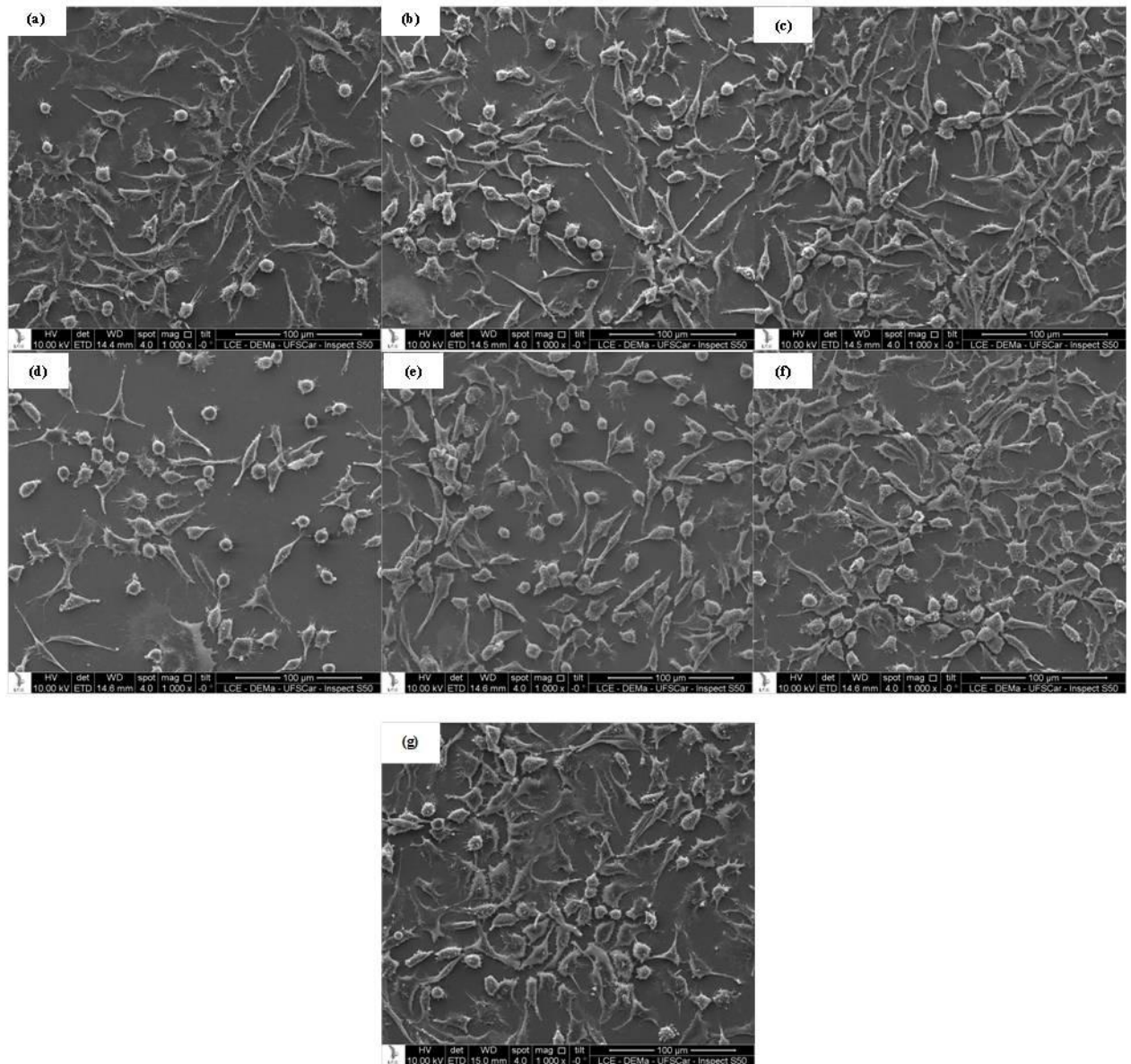


Figura 1. Células L929 em contato com os eluatos de 24 horas dos materiais testados, na seguinte sequência: (a) Ufi Gel P, (b) Sofreliner S, (c) Coe Comfort, (d) Softone, (e) Durabase Soft, (f) Trusoft e (g) Controle (sem eluatos), com aumento de 1000X.

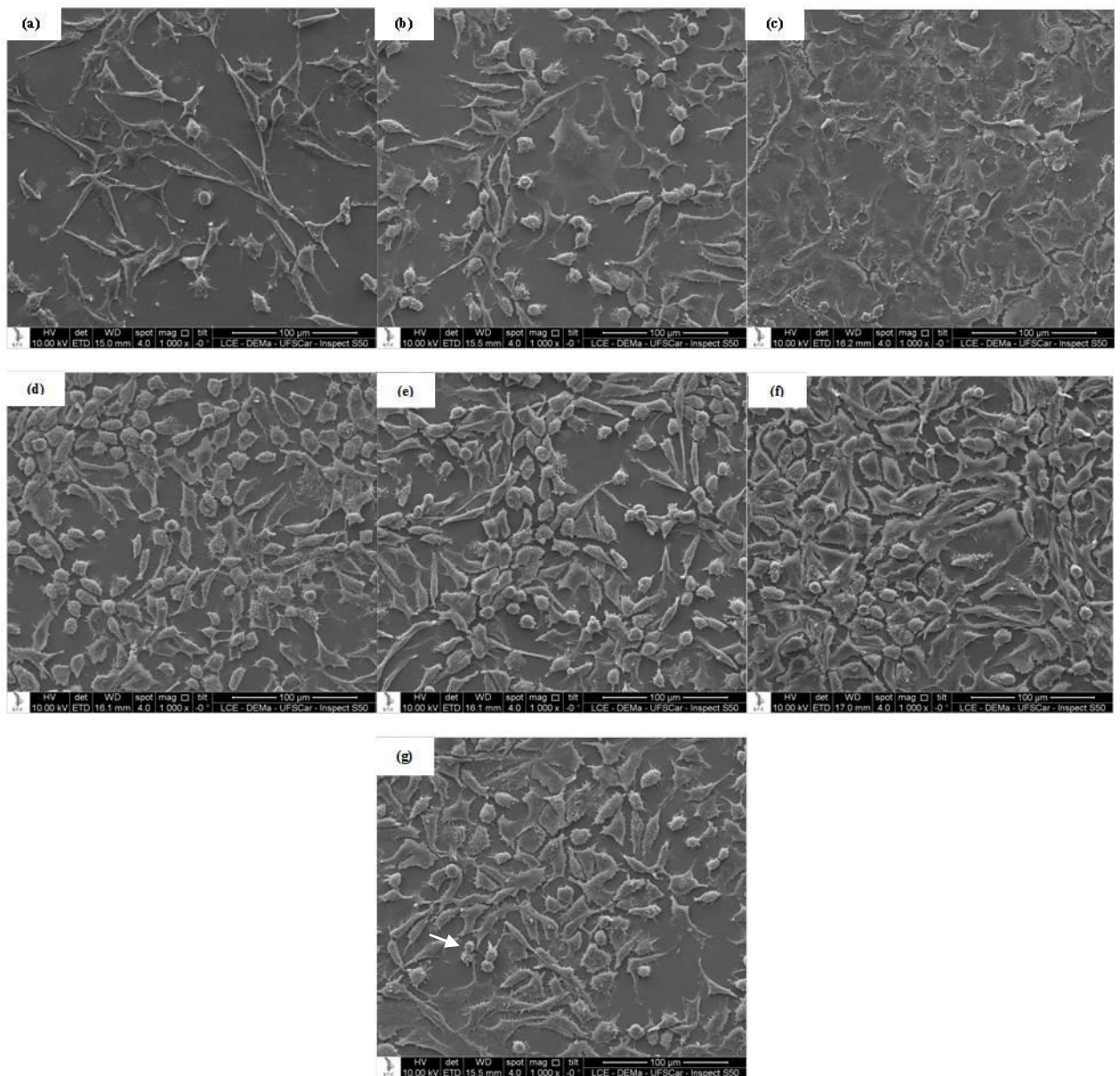


Figura 2 - Células L929 em contato com os eluatos de 48 horas dos materiais testados, na seguinte sequência: (a) Ufi Gel P, (b) Sofreliner S, (c) Coe Comfort, (d) Softone, (e) Durabase Soft, (f) Trusoft e (g) Controle (sem eluatos), com aumento de 1000X.

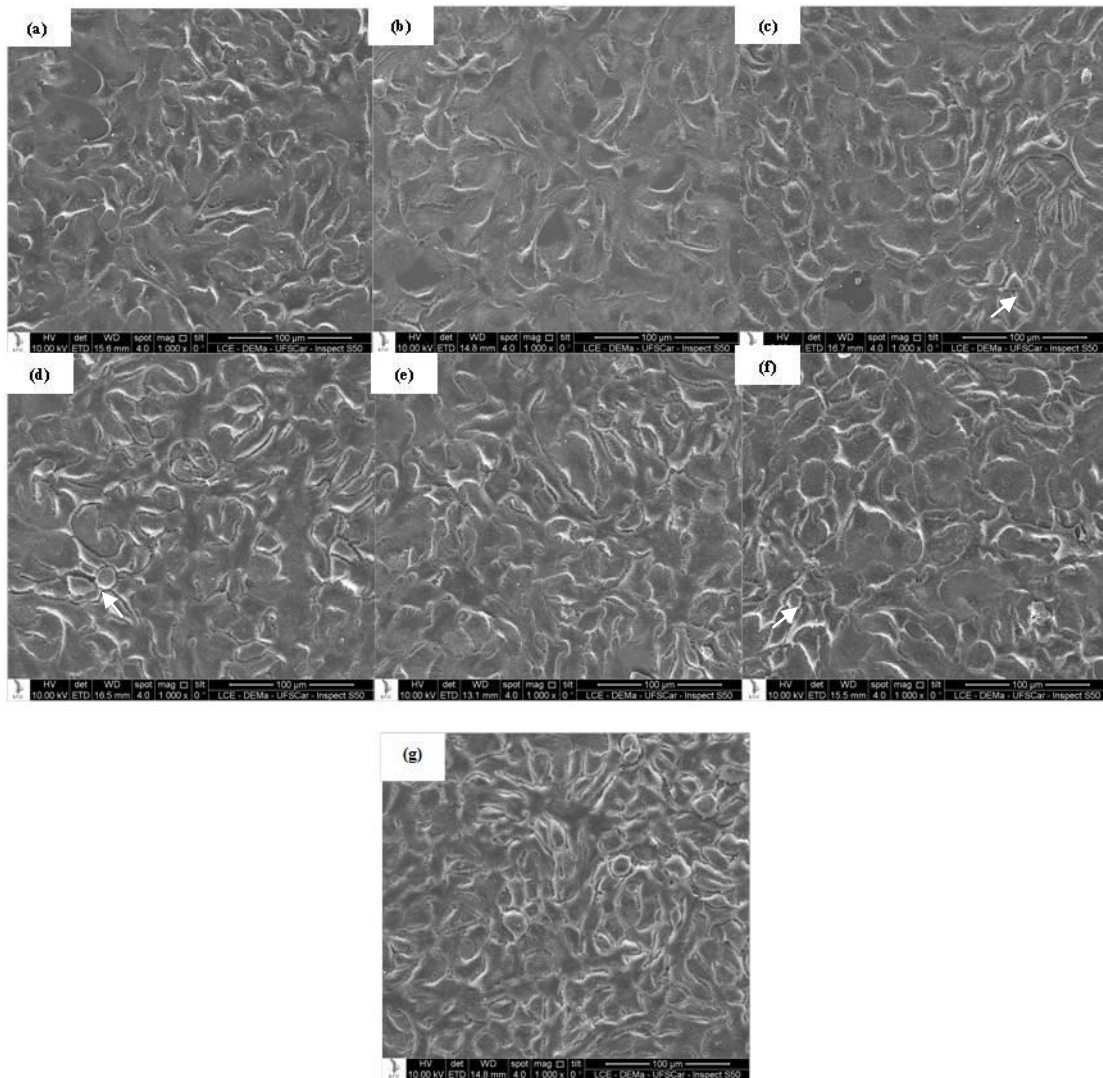


Figura 3. Células HaCat em contato com os eluatos de 24 horas dos materiais testados, na seguinte sequência: (a) Ufi Gel P, (b) Sofreliner S, (c) Coe Comfort, (d) Softone, (e) Durabase Soft, (f) Trusoft e (g) Controle (sem eluatos), com aumento de 1000X.

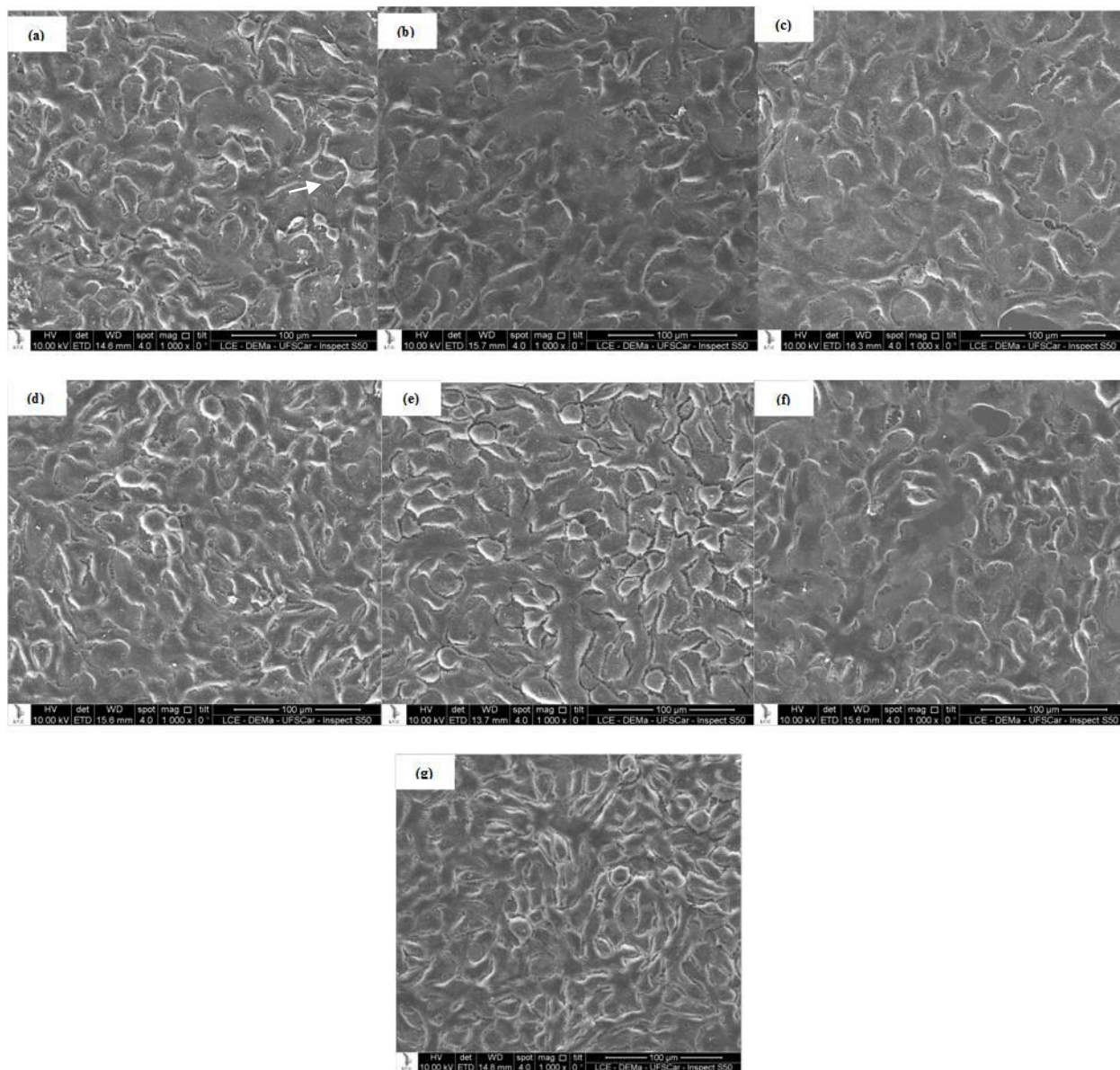


Figura 4. Células HaCat em contato com os eluatos de 48 horas dos materiais testados, na seguinte sequência: (a) Ufi Gel P, (b) Sofreliner S, (c) Coe Comfort, (d) Softone, (e) Durabase Soft, (f) Trusoft e (g) Controle (sem eluatos), com aumento de 1000X.

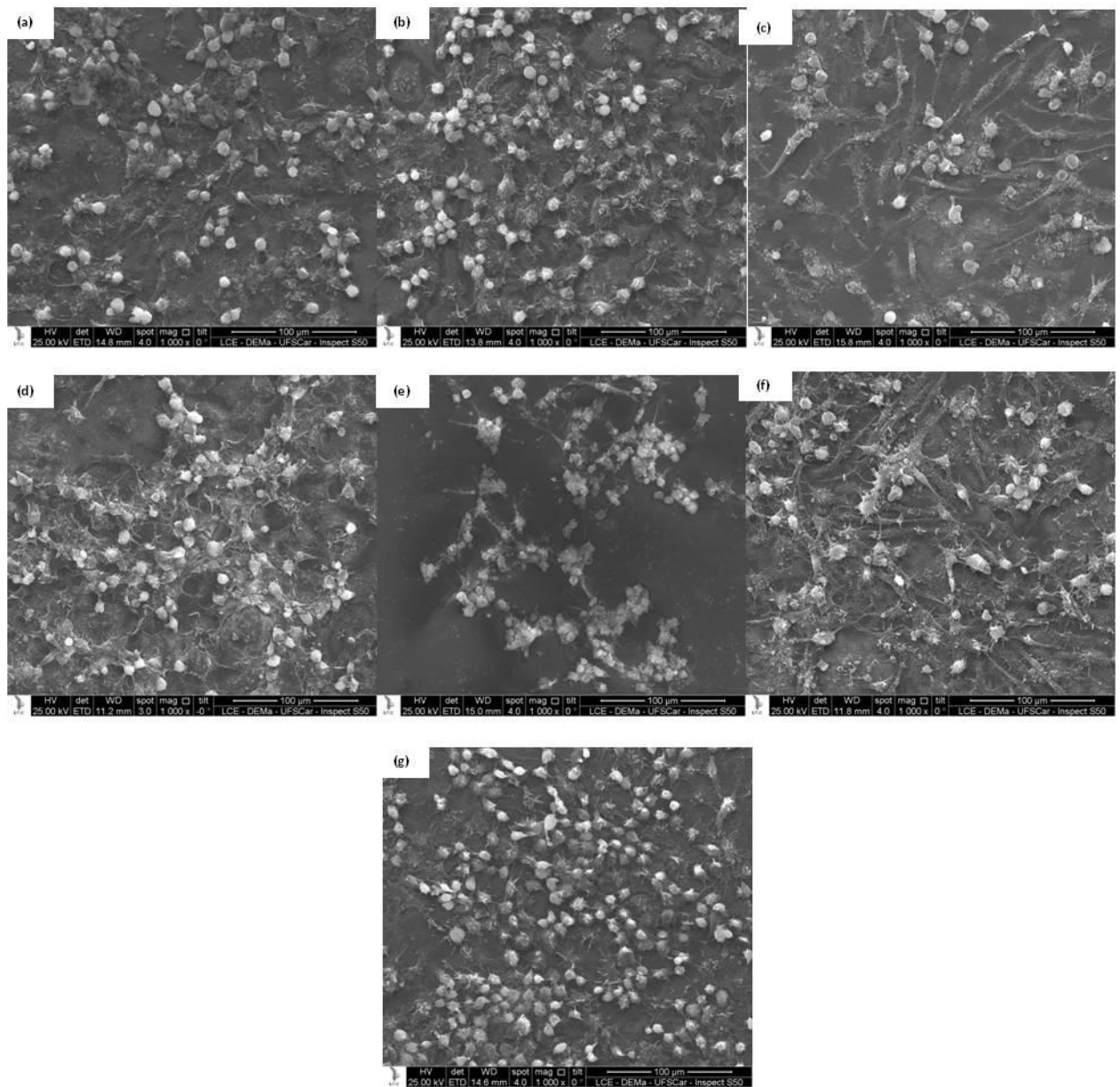


Figura 5. Células Raw 264.7 em contato com os eluatos de 24 horas dos materiais testados, na seguinte sequência: (a) Ufi Gel P, (b) Sofreliner S, (c) Coe Comfort, (d) Softone, (e) Durabase Soft, (f) Trusoft e (g) Controle (sem eluatos), com aumento de 1000X.

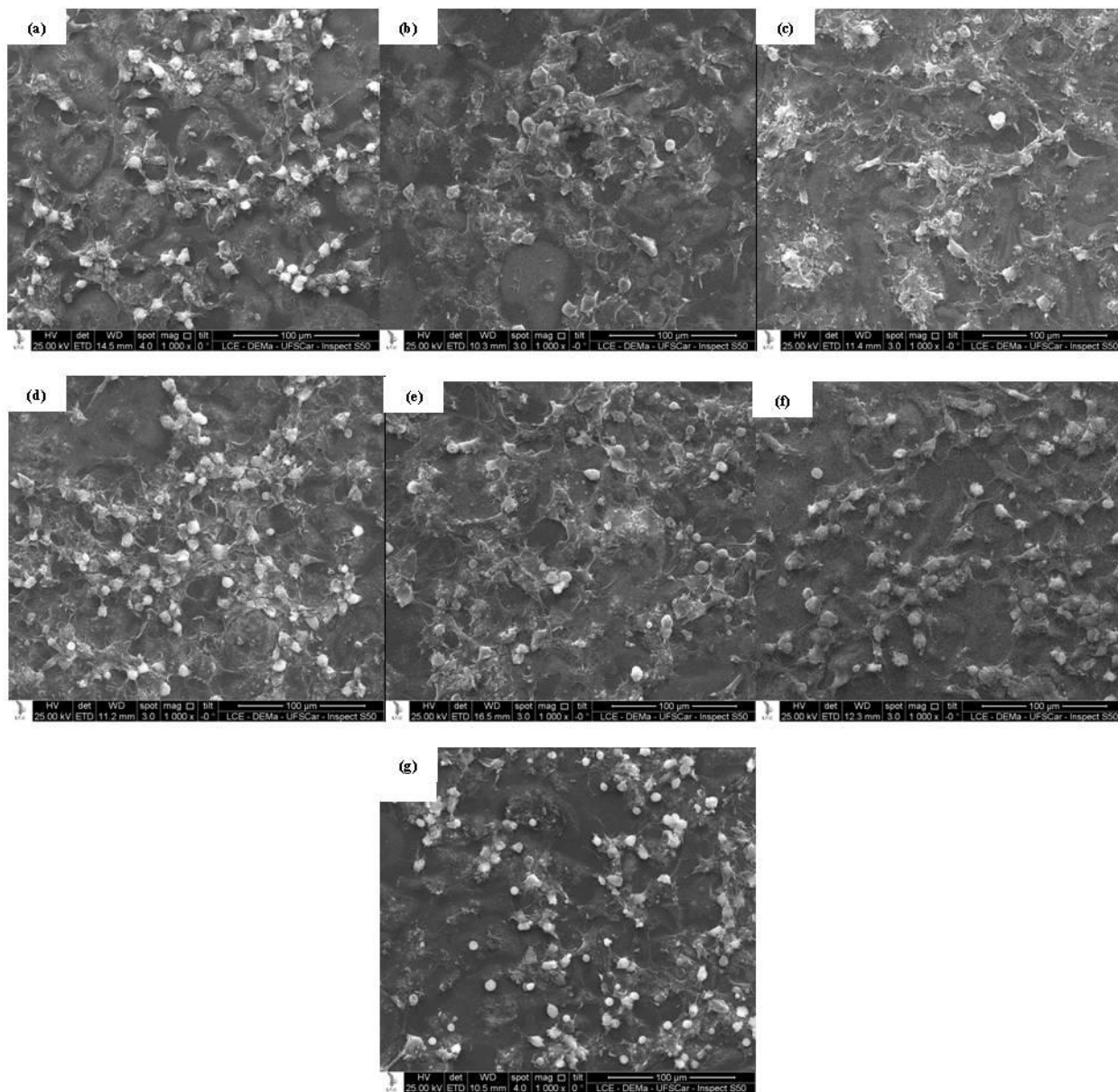


Figura 6. Células Raw 264.7 em contato com os eluatos de 48 horas dos materiais testados, na seguinte sequência: (a) Ufi Gel P, (b) Sofreliner S, (c) Coe Comfort, (d) Softone, (e) Durabase Soft, (f) Trusoft e (g) Controle (sem eluatos), com aumento de 1000X.



Capítulo 3

3.3 Capítulo 3

Title: *Biological effects of soft denture relining materials on L929 cells in vitro.*

**Carolina A.L. Chaves,¹ Carlos E. Vergani,¹ Dominique Thomas,² Anne Young,²
Carlos A. S. Costa,³ Vehid M. Salih,² Ana L. Machado¹**

**¹ UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of
Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara, São Paulo, Brazil**

**² UCL Eastman Dental Institute, Department of Biomaterials and Tissue
Engineering London, UK**

**³ UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of
Physiology and Pathology, Araraquara, São Paulo, Brazil**

Short Title: *Biological effects of soft denture relining materials*

Corresponding author:

**Ana Lucia Machado,
Rua Humaitá, 1680, Araraquara-SP, Brazil**

CEP - 14801-903

Phone: +55 (16) 3301 - 6410

E-mail: cucci@foar.unesp.br; almachado98@uol.com.br

The screenshot shows the Elsevier Editorial System interface for the journal 'Dental Materials'. The user is logged in as 'cucco@foar.unesp.br' with the role of 'Author'. The page displays 'Submissions Being Processed for Author Ana Lucia Machado, DDS, MSc, PhD'. A table lists one submission with the following details:

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail	DEMA-D-13-00259	Biological effects of soft denture reline materials on L929 cells in vitro.	Apr 05, 2013	May 03, 2013	Under Review

Title: *Biological effects of soft denture reline materials on L929 cells in vitro.*

1. Introduction

The development of improved synthetic biomaterials for *in vivo* use is substantiated by the increasing demand for accelerated healing of tissues following trauma, disease or necessary surgical intervention. Regulatory testing of such materials is necessary before their application in patients and follows the normal pattern of *in vitro* testing which is performed prior to *in vivo* evaluation. In the field of dental materials, many of the *in vitro* techniques currently employed are simple, qualitative and typically concentrate on whether cells are harmed *in vitro* or not with respect to cell number or basic cytotoxicity correlation [1]. They rarely reflect the progress in our understanding of extra- and intra-cellular processes, with far more sensitive *in vitro* evaluations now available such as commercially available plate assays. Together, these help to obtain quantifiable data, which is increasingly relevant to evaluating events occurring *in vivo*. Major developments in this field are occurring but many investigators still use less than optimal methods for assessing biomaterials. This paper seeks to elucidate some biological *in vitro* effects of soft reline materials upon a cell line.

Soft denture reline products are compliant, viscoelastic materials used to reline all or part of the surface of a denture which fits and interacts intimately with the oral mucosa tissues [2]. In essence, they serve to distribute the forces of mastication more evenly and to absorb energy. They are also sometimes used in obturators and maxillo-facial prostheses. There are two types of soft reliner currently available, which differ depending on their composition: plasticizer acrylic resin and silicone elastomers [3]. The reline material based on acrylic resin is composed of poly (ethyl methacrylate) (PEMA), monomer and plasticizers [3,4] and the materials based on silicone are essentially composed of dimethyl siloxane [5]. One other soft material developed are those that comprise tissue conditioners [3,6], which are composed of poly (ethyl methacrylate) or similar polymers and the liquid contains no monomer [3], only phthalates, plasticizers and alcohol [7,8,9]. Although widely used, these materials, as the silicone and acrylic resin-based types, have been associated with adverse symptoms including pain, blisters, ulcers, burning sensation and redness and these have been attributed to the leached compounds from such materials [2,10,11,12]. This is particularly relevant as the reliners are placed in direct contact with wounded oral mucosa caused by ill-fitting dentures or, for example, subsequent to implant surgery [3,13].

Tissue wound repair is complex and comprises proteins and processes involved with cell signaling, cell proliferation, migration, apoptosis and tissue remodeling [14]. Integrins, present throughout the cell membrane, are pivotal molecules in the adhesion processes that mediate cell-cell and cell-extracellular matrix communication. Integrins make transmembrane connections to the cytoskeleton and activate many intracellular signaling pathways [15,16]. Currently, there are 24 distinct integrins [16,17]. Among these integrins, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ have been identified in keratinocytes and fibroblasts and participate in the re-epithelization process during wound healing [18,19]. As one of the fibronectin receptors, the integrin $\alpha 5\beta 1$ is highly expressed in human fibroblasts and promotes their motility and survival [20,21]. The fibroblast pericellular matrix also harbors

multidomain adhesive proteins, including fibronectin, glycosaminoglycans and proteoglycans which modulate cell adhesion to the collagen rich extra cellular matrix [22,23]. In contrast, the major component of a clot extracellular matrix is fibrin that forms fibers and contains plasma- derived adhesive glycoproteins (fibronectin and vitronectin). The extracellular matrix present within the fibroblast microenvironment serves as a conduit for cell migration into the wound. To migrate, fibroblasts need to change their interaction with the extra cellular matrix and be able to recognize the new proteins contained in the provisional matrix of the wound. To facilitate this, fibroblasts primarily use receptors of the integrin family [23].

Several studies have suggested that growth factors and their receptors are the key regulators of wound repair [24,25]. The integrins have been shown to regulate several growth factors, including TGF- β ; is a pleiotropic cytokine that mediates a variety of cell functions, such as proliferation and differentiation in many cell types. There are three isoforms TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 [19,26]. TGF- β is secreted in inactive form in a complex with two proteins-LAO and LTB. To activate the TGF- β it is necessary to disassociate the protein complex, which occurs at low pH or through the action of reactive oxygen species, proteases, thrombospondin 1 or several integrins [19]. It is also known that, the integrin $\alpha_5\beta_1$, expressed in re-epithelization during wound healing, has been implicated in the upregulation of TGF- β expressed for keratinocytes and fibroblasts [19].

It is known that both integrin $\alpha_5\beta_1$ and TGF- β 1 play important roles in wound repair [16,25,27]. The cell physiology could be affected by various products leached from polymers [28,29] and this can affect integrin-mediated cellular function [30]. Thus, the hypothesis of this study was that the expression of both integrin $\alpha_5\beta_1$ and TGF- β 1 are increased in L929 cells in contact with six commercially available soft reline materials after short-term (24h or 48h) in vitro exposure.

2. Materials and methods

Six commercially available materials were used in this study as detailed in Table 1.

2.1. Material preparation

Forty-two specimens of each material were prepared under aseptic conditions (18 specimens for Alamar Blue and 12 specimens for each of the ELISA assays). A stainless steel mould (14 x 1.2 mm) was used to fabricate the specimens. Each material was mixed according to the manufacturer's instructions before being placed in the mould upon an acetate sheet and a glass slab. Another acetate sheet and glass slab was placed over the material and light pressure was applied to remove excess material from the mould. The material was then allowed to polymerize or undergo gelation at room temperature. Prior to the biocompatibility tests, samples were sterilized by exposure to ultraviolet light for 20 min each side.

2.2 Cell Culture

The L929 cells were obtained from ECACC, Porton Down, UK and represent a connective tissue fibroblast cell line of murine origin. Cells were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, UK) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% v/v fetal bovine serum (FBS, Gibco, UK). The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5%CO₂ and air. Media were changed every 3 days, and cells were passaged when approximately 80% confluent with 0.05% trypsin in 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma, Poole, UK).

2.3. Cells in direct contact with the materials

L929 were seeded at a density of 1×10^5 cells per well 24 multiwell plates (Corning, Inc., Corning, NY) with 1 ml of culture medium and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 95% air for 24h. After this time, the medium was removed and the samples of each material were placed in the wells, under aseptic conditions, followed by 1mL of DMEM supplemented with antibiotics only, and not FBS. This procedure was undertaken to avoid the uncontrollable serum interaction and/or the neutralization of possible substances released by the materials during the incubation period [31]. Control cultures were selected as medium without serum in contact with the cells under the same culture conditions. The cells were in contact

with the materials for 24h and 48h, respectively, prior to collecting the cell culture supernatants, which were stored at -70°C until required for the ELISA assays.

2.4. Cell Proliferation

Medium was removed and cells were washed with PBS. Alamar Blue was added to the samples (10% v/v of medium), gently mixed and incubated for 3 h. Aliquots of 200 μL from each well were transferred to a black 96-multiwell plate and the fluorescence was measured using a Fluoriskan plate reader (Fluoroskan, Lab Systems) at wavelength 570 nm.

2.5. Human Total Integrin $\alpha 5\beta 1$ - DuoSet IC ELISA (R&D Systems)

After removing the supernatant, the cells were washed twice with PBS, solubilized using Lysis Buffer and the plate was put immediately on ice for 15 min, then stored at $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Before starting the ELISA protocol, the samples were centrifuged at 2000 x g for 5 min and the supernatant was transferred to a clean eppendorf tube.

The capture Antibody was diluted to 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS without carrier protein and 100 μL was immediately added to coat a 96 multiwell plate. In sequence, the plate was sealed and incubated overnight at room temperature. The wells were aspirated and washed three times with Wash Buffer; all Wash Buffer was completely removed by inverting and tapping the plate. Then, 300 μL of Block Buffer was added to each well and the plate incubated at room temperature for 2h. The aspiration/wash step was again repeated 3 times.

The plate was ready for addition of the samples. Thus, 100 μL of test samples were added to the wells, the plate was sealed and incubated for 2h. Another aspiration/wash step was performed 3 times. The Detection Antibody was diluted to a working concentration of 150 ng/mL in IC Diluent, and 100 μL added to each well, the plate was covered again and incubated for 2h. After 3 further washing steps, the Streptavidin-HRP was diluted to the working concentration specified by the manufacturer in IC Diluent, and 100 μL added to each well and left for 20 min. The aspiration/wash step was repeated. Finally, 100 μL of Substrate Solution were added to each well and incubated for 20 min. After this time, 50 μL of Stop Solution were

added to each well and the plate was gently tapped to ensure thorough mixing. The optical density was immediately determined using a spectrophotometer (Tecan, Männedorf, Switzerland) microplate reader at wavelength 450 and wavelength correction set to 540 nm.

2.6. Quantikine ELISA assay for TGF- β 1 (R&D Systems)

The cell culture supernatants from both time points were collected and immediately stored at $\leq 70^{\circ}\text{C}$. Prior to starting the assay proper, the samples were activated using 100 μL of cell culture supernatant, followed by the addition of 20 μL of 1 N HCl and incubated for 10 min at room temperature. Subsequently, this acidification step was neutralized by adding 20 μL of 1.2 N NaOH/0.5 HEPES, and the assay immediately started.

All the reagents were acclimatized to room temperature; the unused microplate strips from the plate frame were removed, returned to the foil pouch and resealed. Then, 50 μL of assay Diluent and 50 μL of Standard, control, or activated sample were added per well, and the plate was tapped, gently mixed and covered with the adhesive plate cover provided, and incubated for 2 h at room temperature. Each well was then aspirated and washed four times using Wash Buffer. Subsequently, 100 μL of TGF conjugate was added to each well. The plate was covered with a new adhesive strip, and incubated for 2h. The aspiration/wash step was repeated. In sequence, 100 μL of Substrate Solution were added to each well and incubated for 30 min. The plate was protected from light using foil. After this time, 100 μL of Stop Solution were added to each well and the plate was gently tapped and gently mixed. Finally, 100 μL of Stop Solution and 100 μL of Substrate Solution were used as a Blank. The optical density was read at wavelength 450 nm and wavelength correction set to 540 nm.

The Alamar Blue assay was performed in triplicate on three separate occasions. Each of the ELISA assays was performed in triplicate on at least two occasions.

Prior to statistical analysis, results from the Alamar Blue assay were normalized to the absorbance of the control cultures (medium without serum). For both ELISA assays, standard curves were created using Readerfit software (Hitachi Solutions America Ltd.) capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit, and the concentration (pg/mL) of each protein in each sample tested was calculated. Data from Alamar Blue assay and ELISA assays were tested for normality using the Shapiro – Wilk test. The data were then tested for significance using a Mixed Design 2-way ANOVA for the Alamar Blue data and Independent 2-way ANOVA for the integrin and TGF data, respectively. The statistical analysis software used was SPSS v.17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Differences between test groups were assessed using post hoc HSD Tukey's test. Statistical significance was considered at $p < 0.05$. For Alamar Blue assay data, a comparison between the two periods of direct contact of the cells with the materials was conducted using 95% confidence intervals with Bonferroni correction ($\alpha = 0,0083$). For TGF assay data, post-hoc analysis followed a simple effects approach and evaluated which material(s) contributed to the differences. This was performed in order to improve statistical power as well as to clarify interpretation of results [32].

3. Results

3.1. Alamar Blue

The two-way ANOVA of Alamar Blue assay showed significant effects for the factors material type, time in culture, as well as the interaction between them ($p < 0.001$, respectively). For both periods, the highest percentage of cell viability was observed for Sofreliner S, followed by Ufi Gel P and Trusoft, while the lowest means were obtained with materials Durabase Soft, Coe Comfort and Softone, which did not differ from one another (Table 2). For Sofreliner S, Trusoft, Durabase Soft and Coe Comfort, there were significant differences between the two periods, with higher mean values at 48h.

3.2. Integrin

The results of the two-way ANOVA of integrin data revealed that there were significant effects for material type ($p = 0.018$) and time in culture ($p < 0.001$), but not for their interaction ($p = 0.780$). Table 3 indicates a significant difference between Coe Comfort and Trusoft, but only Trusoft resulted in a mean integrin value (pg/ml) less than control. With regard to the time in culture, the mean protein concentration obtained after 48 h (7941 ± 594) pg/mL of direct contact was significantly higher compared to 24 h (7273 ± 391) regardless of the material type.

3.3. TGF

The results of two-way ANOVA for TGF data demonstrated that the factors material type and time in culture ($p < 0.001$), as well as their interaction ($p = 0.030$) showed significant effects. Table 4 shows the comparisons among materials, which were performed within each period. After 24h in culture, there were no significant differences in TGF expression among materials. However, after 48h in culture the lowest expression was seen for Coe Comfort and the highest for Softone, both tissue conditioners.

4. Discussion

Materials placed in the oral cavity are exposed to a complex variety of substances including proteins, enzymes, numerous microbiota as well as a heterogenous mix of substances originating from dietary intake. Together, this concoction will have profound and permanent effects upon the materials leading to biodegradation and subsequent mechanical and chemical changes, which may compromise the material function [33]. Furthermore, these biodegradation effects will lead to component products leaching from this chemical and mechanical ‘failure’ of the materials. Indeed, the impact of reline material biodegradation on the physiological processes of local cells and tissues is rarely reported in the literature, with studies often limited to cytotoxicity tests i.e. whether the cells ‘live or die’. Although denture base polymers are widely used clinically, some attention as to their clinical significance and use has been raised [34,35].

To evaluate the *in vitro* biocompatibility of a denture base materials, this should be performed with the most appropriate cell types to mimic the interaction between materials and cells. While *in vitro* experiments are very useful for initial screening and high throughput analyses, interpretation of such results needs to be undertaken with caution when making comparisons and relating findings to *in vivo* physiology. The choice of cells needs careful consideration as such materials can come into contact with both epithelial and underlying exposed connective tissue cells. Soft denture reline materials are important to patients as they provide comfort and distribute load across the contact area between the denture and oral mucosa. However, there is evidence that such materials indeed cause adverse reactions to the oral tissue including ulceration, burning sensation and gingivitis [10,12]. Thus, for this study, a very conventional and widely-used cell line was chosen; namely L929 cells (mouse connective tissue fibroblasts, ECACC, UK) to represent the sub-epithelial connective tissue. This study utilized the Alamar Blue cell metabolism assay [36] and two ELISA 96-well assays, namely Integrin $\alpha 5\beta 1$ and TGF- $\beta 1$. Alamar Blue, unlike many other cell metabolism/proliferation assays, allows continuous monitoring of the same cell population throughout the entire study period.

It has been reported that soft relining materials do leach compounds and by-products of degradation. For example, phthalates (Table 1) and esters of aromatic carboxylic acids are used as plasticizers in acrylic soft lining materials [2,10,11,12]. The results showed that the two silicone materials (Ufi Gel P and Sofreliner S) were the least toxic and, indeed, Sofreliner S induced the greatest metabolic response in L929 cells after 48 h compared to the control cells. This was to be expected as these two materials are addition-polymerizing silicones and do not comprise any of the more toxic plasticizer or acrylic components of the remaining materials. The two acrylic-based materials (Trusoft and Durabase Soft) induced less metabolic activity (60.7 - 90.4% and 6.2 - 8.2%), respectively, over the 48 h time in culture compared to the control cells. Both of phthalate-based these contain acrylic resins, although

Trusoft does not have a monomer phase, which may explain the greater cellular metabolic response compared to Durabase Soft. Furthermore, the two polyethyl methacrylate tissue conditioners (Softone and Coe Comfort) exhibited the least metabolic response by the cells with no more than 11.2% compared with the control rates after 48 h in culture. The leaching out of the plasticizer and ethyl alcohol components, and the probable enhancement of hydrolytic biodegradation by the absorption of water into the materials could account for this marked decrease in Alamar Blue reduction by the cells [37,38].

In this study, the cells were temporarily devoid of growth factors during 48 h in culture (due to lack of serum in the medium), as well as the adverse effects of the leachants on the cells, together may have slightly increased the integrin expression after 48 h compared to 24 h. These were marked differences compared to those changes observed in the TGF- β 1 data. For example the range of percentage increase of integrin protein was 8% - 13% for the 6 materials from 24h to 48h in culture, whereas for TGF- β 1, the range of percentage increase was 12% - 75% for the reline materials. This suggests that TGF- β 1 protein expression was markedly increased over the culture period compared with integrin. Amongst the highest percentage increases after 48 h that were observed in the Elisa assays, Durabase Soft, Sofreliner S, Trusoft and Softone were deemed the materials that had the greatest effect on expression of both integrin and TGF- β 1.

Integrins are heterodimeric receptors for cell-surface adhesion molecules and numerous extracellular matrix proteins. Various α and β subunits are expressed in combinations exhibiting different ligand specificities [39]. For example, integrin α 5 β 1, exhibits ligand specificity for fibronectin and fibrin, important ECM glycoproteins which play a major role in adhesion, migration, cell growth, differentiation and are vital for processes such as wound healing [40]. Integrin α 5 β 1 has also been implicated in tumor angiogenesis but there is some controversy whether it is associated with tumor suppressive effects or it may have a promoter role [41]. Integrins mediate a host of downstream cell signalling events in response to their

ligation with the ECM components, and these cascades have profound effects on normal cellular activities as well as life or death events such as apoptosis. Indeed, cells that cannot adhere effectively to their substratum/ECM undergo apoptotic events far more readily than those cells denied growth factors [42]. Integrins have also been implicated in controlling resistance to apoptotic stimuli, and in particular to signals that activate the mitochondrial pathway. Chemical insults, including many cytotoxic drugs, or leachants from dental materials and serum withdrawal can lead to mitochondrial release of cytochrome C [43]. Integrins have been shown to protect cell viability in response to stress. Signaling by integrins regulates both the expression and activity of several members of the Bcl-2 proteins which are associated with apoptosis [44]. The ligation of integrin $\alpha 5\beta 1$ leads to increased expression of Bcl-2 [45] and increased resistance to serum withdrawal.

Transforming growth factor β (TGF β) protein family consists of three cytokines, (TGF β 1, 2, and 3) with TGF β 1 being the most abundant isoform in many tissues. TGF β binds to specific heterodimer receptors causing the intracellular phosphorylation of Smad proteins. These, in turn, bind with Smad4 to form heteromeric complexes, which translocate to the nucleus and regulate TGF β responsive genes [46]. TGF- β molecules are deemed to act as cellular switches that regulate a wide variety of cellular processes such as immune function, cell proliferation, and epithelial-mesenchymal transition and hematopoiesis [47]. In this study, TGF β 1 showed enhanced up-regulation in cells maintained for 48 h compared with those maintained for 24 h in culture. In particular, Ufi Gel P, Durabase Soft and Softone showed marked increases from 24 h – 48 h of 30%, 40% and 75%, respectively. The large difference in expression observed after 48h in the tissue conditioners may be due to the very different compositions of Softone and Coe Comfort, respectively. The latter material has numerous compounds not present in Softone, which may have contributed to the decreased expression. An increase in TGF β 1, and also integrins, has been associated with the maturation of a proto-myofibroblast to a mature myofibroblast [48,49], which is characteristic of healing

wounds. It has also been reported that increased levels of TGF β 1 increases keratinocyte proliferation, which would be necessary in areas of oral mucosa devoid of a keratinized epithelium.

The absence of serum in the culture system described here suggests that the proteins TGF β 1 and integrin α 5 β 1, as detected by the ELISA assays, must have been secreted by the cells and that the relative expressions of each protein were due to the leachants of the reline materials. However, it is important to note that this was an acute study only depicting cell activity over 48 h in culture.

The in vitro testing of dental materials introduces some dilemmas regarding the translation of such information. On one hand, a very controlled environment can be created with known variables and an ability to measure cell response in detail and with some precision. Thus, in vitro tests such as those described in this study, provide fundamental information for identifying specific mechanisms of cellular response in the presence of materials as well as correlation of their clinical performance [50]. However, no matter how much control of the in vitro environment is imposed, the diverse and complex in vivo mechanisms can never be fully mirrored in vitro. Nonetheless, the results of this study have revealed how 6 commercially available soft reline materials can trigger the expression of particular cellular proteins related to wound healing and other cell processes in the oral cavity.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the following agencies for funding of this work: FAPESP (grant numbers - 2010/08750-0, 2010/11764-3, 2012/07994-9), CAPES and CNPq (grant number - 302543/2010-4). The authors are also grateful to Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza (USP) for providing assistance with statistical analyses and also to Prof. J.C. Knowles for laboratory access and facilities at UCL Eastman Dental Institute.

REFERENCES

1. Wiegand C, Hipler U. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*. 2008;3:1-9.
2. Shanmuganathan N, Padamanabhan TV, Subramaniam R, Madhankumar S. The compliance of temporary soft lining materials - an in vivo & vitro study. *International Journal of Scientific and Research Publications* 2012;2:1-7.
3. Murata H, Hamada T, Sadamori S. Relationship between viscoelastic properties of soft denture liners and clinical efficacy. *The Japanese Dental Science Review* 2008;44:128-32.
4. Garcia LT, Jones JD. Soft liners. *Dental Clinics of North America* 2004;48:709-20.
5. Cazacu M, Racles C, Vlad A, Antohe M, Forna N. Silicone-based composite for relining of removable dental prosthesis. *Journal of Composite Materials* 2009;43:2045-55.
6. Murata H, Narasaki Y, Hamada T, McCabe JF. An alcohol-free tissue conditioner - A laboratory evaluation. *Journal of Dentistry* 2006;34:307-15.
7. Park SK, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Changes in properties of short-term-use soft liners after thermocycling. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004;31:717-24.
8. Munksgaard EC. Leaching of plasticizers from temporary denture soft lining materials. *European Journal of Oral Sciences* 2004;112:101-4.
9. Munksgaard EC. Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *European Journal of Oral Sciences* 2005;113:166-9.
10. Zaki HS, Ketzan KJ, Carrau RL. Hypersensitivity to temporary soft denture liners: A clinical report. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1995;73:1-3.
11. Sofou A, Tsoupi I, Karayannis M, Owall B. Determination of residual monomers released from soft lining materials with the use of HPLC. *Pakistan Journal of Analytical Chemistry* 2007;8:41-52.
12. Mutluay MM, Oguz S, Fløystrand F, Saxegaard E, Dogan A, Bek B, *et al.* A prospective study on the clinical performance of polysiloxane soft liners: one-year results. *Dental Materials Journal* 2008;27:440-7.

13. Sadig W, Almas K. Risk factors and management of dehiscence wounds in implant dentistry. *Implant Dentistry* 2004;13:140-6.
14. Katz BZ, Zamir E, Bershadsky A, Kam Z, Yamada KM, Geiger B. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Molecular Biology of The Cell* 2000;11:1047-60.
15. Bella J, Berman HM. Integrin-collagen complex: a metal-glutamate handshake. *Structure* 2000;8:121-26.
16. Hynes. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machine. *Cell* 2002;110:673-87.
17. Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology* 2000;24:127-52.
18. Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M, Giannetti A. Distinctive integrin expression in the newly forming epidermis during wound healing in humans. *The Journal of Investigative Dermatology* 1993;101:600-4.
19. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Reports* 2010;11:97-104.
20. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:6161-5.
21. Lobert VH, Brech A, Pedersen NM, Wesche J, Oppelt A, Malerød L, *et al.* Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Developmental Cell* 2010;19:148-59.
22. Heino J, Käpylä J. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Current Pharmaceutical Design* 2009;15:1309-17.
23. Larjava H. **Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management.** 1st ed., Oxford, John Wiley & Sons, Ltd; 2012.
24. Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa.

Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology 2003;32:358-66.

25. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. Clinics in Dermatology 2007;25:9-18.

26. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming Growth Factor- β : Biological function and chemical structure. Science 1986;233:532-34.

27. Horiba K, Fukuda Y. Synchronous appearance of fibronectin, integrin vinculin and actin in epithelial cells and fibroblasts during rat tracheal wound healing. Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology 1994;425:425-34.

28. Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y. Cytotoxicity of methyl methacrylate (MMA) and related compounds and their interaction with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes as a model for biomembranes. Oral Diseases 2000;6:215-21.

29. Chaves CA, Machado AL, Carlos IZ, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. Dental Materials 2010;26:1017-23.

30. Panda G. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. Current Opinion in Cell Biology 2000;12:569-74.

31. Roberta T, Federico M, Federica B, Antonietta CM, Sergio B, Ugo C. Study of the potential cytotoxicity of dental impression materials. Toxicology in Vitro 2003;17:657-62.

32. Portney LG, Watkins MP. **Foundations of Clinical Research Applications to Practice**. 2nd ed. London, Prentice-Hall; 2000.

33. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, Castro MF. Biodegradation of acrylic based resins: A review. Dental Materials 2010;26:e171-80.

34. Ebadian B, Razavi M, Soleimanpour S, Mosharraf R. Evaluation of tissue reaction to some denture-base materials: an animal study. The Journal of Contemporary Dental Practice 2008;1:67-74.

35. Boeckler AF, Morton D, Poser S, Dette KE. Release of dibenzoyl peroxide from polymethyl methacrylate denture base resins: an in vitro evaluation. *Dental Materials* 2008;24:1602-7.
36. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2009;2:514-48.
37. Jones DW, Sutow EJ, Hall GC, Tobin WM, Graham BS. Dental soft polymers: plasticizer composition and leachability. *Dental Materials* 1988;4:1-7.
38. Wilson J. In vitro loss of alcohol from tissue conditioners *International Journal of Prosthodontics* 1992;5:17-21.
39. Rupp PA, Little CD. Integrins in vascular development. *Circulation Research* 2001;89:566-72. Review.
40. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *Journal of cell science* 2002;115:3861-3.
41. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M. Integrin $\alpha 5\beta 1$, the fibronectin receptor, as a pertinent therapeutic target in solid tumors. *Cancers* 2013;5:27-47.
42. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 1994;124:619-26.
43. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
44. Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of Cell Science* 2002;115:3729-38.
45. Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha (v)\beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:27757-63.
46. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577-84. Review.
47. Tandon A, Tovey JC, Sharma A, Gupta R, Mohan RR. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Current Molecular Medicine* 2010;10:565-78.

48. Larjava H, Salo T, Haapasalmi, Kramer RH, Heino J. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 1993;92:1425-35.
49. van Beurden H. Characterization of fibroblast phenotypes in intra-oral wound healing. Thesis Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands. 2005.
50. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials* 2012;28:23-40. Review.

Table 1 - Materials evaluated in this study.

Product	Type	Manufacturer	Powder/Liquid ratio	Composition	Batch number	Polymerization/gelation time at room temperature
Durabase Soft	Plasticized acrylic resin soft liner	Reliance Dental Co., III., USA	MFG 1g/0.83 mL	Powder – PEMA and benzoyl peroxide Liquid – MMA and DBP	29549	15 min
Trusoft	Plasticized acrylic resin soft liner	Bosworth Co, Skokie, IL, USA	1.06g/1.15mL	Powder – PEMA Liquid – Benzyl butyl phthalate (plasticizer) and ethyl alcohol	0904-137	6 min
Ufi Gel P	Silicone-based soft liner	Voco, Cuxhaven, Germany	Base and catalyst in a 1:1 ratio	Base – Modified Polydimethylsiloxane (A-silicone) Catalyst- platinum catalyst	1009051	10 min
Sofreliner S	Silicone-based soft liner	Tokuyama Dental Corp., Tokyo, Japan	Auto-dispensing system	Polyorganosiloxane Silicone resin powder Silica, amorphous	035E50	5 min
Softone	Tissue conditioner	Bosworth Co, Skokie, IL, USA	1.03g/1.1mL	Powder – PEMA Liquid – DPB and ethanol	0906-231	8 min
Coe Comfort	Tissue conditioner	GC America Inc, Alsip, IL, USA	1g/0.83 mL	Powder – PEMA and zinc undecylenate Liquid – Benzyl Benzoate, cotton seed oil, ethanol, acetyl tributyl citrate, methyl salicylate, and peppermint oil	1006032	10 min

PEMA, poly (ethyl methacrylate); MMA, methyl methacrylate; DBP, di-butyl phthalate.

Table 2 - Mean percent values (\pm SD) for the Alamar blue assay.

Materials	24 h	48 h	Difference (CI)
Ufi Gel P	76.3 (20.4) ^B	78.1 (12.1) ^B	-1.8 (-22.8 to 19.2)
Sofreliner S	97.2 (34.3) ^C	141.1 (47.5) ^C	-43.9 (-60.0 to -27.8)*
Trusoft	60.7 (9.1) ^B	90.4 (21.8) ^B	-29.6 (-47.9 to -11.3)*
Durabase Soft	6.2 (2.0) ^A	8.2 (1.5) ^A	-2.0 (-2.9 to -1.1)*
Coe Comfort	6.5 (2.0) ^A	8.3 (1.5) ^A	-1.7 (-2.8 to -0.6)*
Softone	8.1 (0.6) ^A	11.2 (3.4) ^A	-3.2 (-6.7 to 0.4)

For each period, mean percent values with the same letters (A, B, C) are not statistically different ($p > 0.05$). Those with different letter assignments are different.

* - Significant difference for comparison between the two periods, using 95% confidence intervals (CI) with Bonferroni correction ($\alpha = 0.0083$).

Table 3 - Mean values (\pm SD) for integrins for each material, in pg/mL.

Materials	24 h	48 h	HSD test [*]
Ufi Gel P	7293 (194)	7892 (353)	AB
Sofreliner S	7266 (391)	8072 (600)	AB
Trusoft	6914 (384)	7313 (521)	A
Durabase Soft	7182 (448)	7992 (513)	AB
Coe Comfort	7316 (414)	8236 (861)	B
Softone	7383 (318)	7917 (557)	AB
Medium without FBS	7697 (299)	8084 (442)	B

^{*}Regardless of each time period, mean percent values with the same letters (A and B) are not statistically different ($p>0.05$). Those with different letter assignments are different.

FBS - fetal bovine serum

Table 4 - Mean values (\pm SD) for TGF for each material, in pg/mL.

Materials	24 h	48 h
Ufi Gel P	2298 (239) ^A	3008 (350) ^{BC}
Sofreliner S	2126 (410) ^A	2264 (806) ^{AB}
Trusoft	1691 (147) ^A	2111 (198) ^{AB}
Durabase Soft	1426 (122) ^A	2200 (644) ^{AB}
Coe Comfort	1565 (316) ^A	1751 (290) ^A
Softone	2067 (642) ^A	3625 (527) ^C
Medium without FBS	2048 (507) ^A	2006 (625) ^{AB}

For each period, mean percent values with the same letters (A, B, C) are not statistically different ($p > 0.05$). Those with different letter assignments are different.

FBS - fetal bovine serum



Capítulo 4

3.4 Capítulo 4

Title: *Análise de cito/quimiocinas expressas por macrófagos quando em contato com materiais reembasadores resilientes.*

**Carolina A.L. Chaves,¹ Carlos E. Vergani,¹ Pedro Paulo Chaves de Souza,²
Carlos A. S. Costa,² Ana L. Machado¹**

**¹ UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of
Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara, São Paulo, Brazil**

**² UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of
Physiology and Pathology, Araraquara, São Paulo, Brazil**

Short Title: *Biological effects of soft denture relining materials*

Corresponding author:

Ana Lucia Machado,

Rua Humaitá, 1680, Araraquara-SP, Brazil

CEP - 14801-903

Phone: +55 (16) 3301 - 6410

E-mail: cucci@foar.unesp.br; almachado98@uol.com.br

Introdução

Nos tratamentos de reabilitação oral com próteses removíveis totais ou parciais, os materiais reembasadores resilientes têm sido frequentemente utilizados com o objetivo de proporcionar melhor adaptação e conforto aos pacientes que apresentam reabsorção do rebordo alveolar, bruxismo, xerostomia e sensibilidade^{26,33}. Esses materiais podem ser à base de resina acrílica, contendo poli(etil metacrilato), monômero e plastificante (ésteres de ftalato)³³, ou à base de silicone, com composição similar à dos materiais de moldagem (vinil poli siloxano)⁷. Outros materiais resilientes têm sido desenvolvidos especificamente como condicionadores de tecidos^{33, 47}, sendo compostos de poli(etil metacrilato) ou co-polímero relacionado, plastificantes, como ftalatos, e etanol^{12,31,32,44} e não contêm monômero^{14,33}.

Tem sido demonstrado que os materiais reembasadores resilientes, à base de resina acrílica ou silicone, liberam componentes residuais como monômeros, plastificantes e produtos de degradação^{5,6,49}. Os condicionadores de tecidos também liberam plastificantes e álcool^{7,12,31,32}. Substâncias liberadas na saliva, a partir desses materiais, podem ser transportadas para a mucosa oral e/ou do trato gastrointestinal e causar reações adversas como dor, vesículas, ulcerações, sensação de ardência e vermelhidão^{27,35,60}. Esse aspecto é particularmente importante tendo em vista que esses materiais também têm sido amplamente utilizados em áreas de tecidos ulcerados e inflamados pela ação mecânica de próteses mal adaptadas³³, em próteses obturadoras após cirurgias maxilo-faciais^{3,41}, em casos que apresentam áreas recém

operadas, regiões com lesões crônicas, trauma na mucosa bucal, bruxismo, pacientes com avitaminoses ou doenças debilitantes e em próteses imediatas ou durante o período de osseointegração de implantes ^{43,55}.

A cicatrização de feridas ou áreas cirúrgicas é um processo dinâmico envolvendo várias células e diversos mediadores ¹⁰. O processo completo é constituído de diferentes fases que têm sido denominadas de coagulação, inflamação, proliferação e remodelação ⁴⁶. Além dos fibroblastos, os macrófagos também apresentam papel importante no reparo de feridas e a ausência dessas células afeta significativamente a cicatrização. A depleção de macrófagos em ratos resultou em atraso na reepitelização, reduziu a deposição de colágeno e afetou a angiogênese ²⁸. Além disso, em feridas em que houve depleção de macrófagos, os fibroblastos não foram capazes de se transformar em miofibroblastos ¹³. Os macrófagos são os maiores componentes do sistema imunológico e apresentam um papel relevante nas respostas inflamatórias ³⁸. Nos órgãos, os macrófagos estão expostos aos agentes externos, incluindo não somente bactérias, fungos e vírus, mas também poluentes, como substâncias químicas presentes no meio. Assim, nos estágios iniciais da inflamação, as funções dos macrófagos são destruir patógenos, remover células (neutrófilos) apoptóticas e apresentar antígenos para os linfócitos T ^{20,58}. Essas células sinalizam a presença desses agentes externos, iniciando uma resposta imunológica, por meio da secreção de diversas citocinas ^{1,17,20}.

As citocinas são proteínas reguladoras, de baixo peso molecular, secretadas por vários tipos de células e que apresentam importante papel por modular as

respostas imunológicas inatas e adaptativas ¹. São responsáveis pela iniciação, mediação, e propagação das respostas inflamatórias. Além disso, estão envolvidas em vários outros processos imunológicos como a ativação de linfócitos, proliferação, diferenciação, angiogênese e apoptose ^{1,40}. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua geralmente na fase inicial durante a inflamação, ativando células locais ⁸, e sua liberação é indicativa de efeitos pró-inflamatórios. É produzido por diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos, células T, células musculares lisas, adipócitos e fibroblastos. As respostas biológicas relacionadas ao TNF- α ocorrem por meio de ligação a receptores existentes na membrana de todos os tipos de células (exceto eritrócitos). Esses receptores diferem nas suas afinidades de ligação, bem como nas vias de sinalização intracelular, levando a apoptose, a ativação do fator de transcrição NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas ⁴⁵. A interleucina 1 β (IL-1 β), conhecida por ser uma citocina pró-inflamatória que possui múltiplas atividades biológicas ligadas à imunopatologia de doenças inflamatórias crônicas e agudas ⁵⁶, é produzida por vários tipos de células em resposta a estímulos como inflamação, agentes infecciosos ou endotoxinas microbianas ²⁹.

A inflamação também causa a liberação de quimiocinas que induzem a migração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos e macrófagos para a área afetada ^{8,52}. As quimiocinas podem ser divididas em 4 grupos: CCL, CXCL, CX3CL e CL que se ligam aos seus receptores CCR, CXCR, CX3CR e CR, respectivamente

²². Todas as quimiocinas apresentam os mesmos elementos estruturais incluindo resíduos de cisteína que formam ligações (pontes dissulfeto) que são determinantes da estrutura terciária específica das quimiocinas. Assim, nas quimiocinas (CCL, CXCL, CX3CL e CL), X é o número de amino ácidos entre os resíduos de cisteína no local do terminal NH₂- da molécula ⁶¹. As quimiocinas CXCL são mais ativas sobre células polimorfonucleares, células T e B, enquanto as quimiocinas CCL exercem sua ação mais nos eosinófilos, monócitos, basófilos células T e NK. Uma característica geral da rede de quimiocinas é a possibilidade de ligação com seus receptores: a maioria desses receptores interagem com mais de uma quimiocina; da mesma forma, a maioria das quimiocinas reconhecem múltiplos receptores. Isso se aplica particularmente para as quimiocinas inflamatórias, enquanto as quimiocinas homeostáticas apresentam uma relação mais seletiva com seus receptores. Assim, apesar da expressão celular específica de receptores definidos, as quimiocinas apresentam um grau aparentemente alto de redundância na migração leucocitária ³⁰.

Embora os possíveis efeitos citotóxicos das substâncias liberadas por materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos tenham sido avaliados ^{15,19,42,51}, os testes frequentemente utilizados baseiam-se na quantificação da atividade enzimática mitocondrial, principalmente da enzima desidrogenase succínica, relacionando à quantidade de células viáveis. Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos desses materiais sobre a produção de citocinas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a produção de 7 mediadores inflamatórios por macrófagos (RAW 264.7) expostos a eluatos de 24 ou 48 horas

obtidos a partir de 4 materiais reembasadores resilientes e 2 condicionadores de tecidos.

Material e métodos

Preparo dos corpos de prova

Os materiais selecionados para esse estudo estão apresentados na Tabela 1.

Os corpos de prova de cada material foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas previamente esterilizadas, contendo cavidades em forma de discos ($10 \times 1 \text{ mm}$)⁵¹. Os materiais, proporcionados e manipulados de acordo com instruções dos fabricantes, foram inseridos nas matrizes, prensados manualmente entre duas placas de vidro esterilizadas com duas folhas de acetato, também esterilizadas, até o término da reação. Os corpos de prova foram colocados em sacos plásticos estéreis hermeticamente fechados no banho de ultra-som (20 minutos), sendo, em seguida, expostos à luz ultravioleta na câmara de fluxo laminar (20 minutos) para cada lado do corpo de prova com o objetivo de eliminar os possíveis microorganismos remanescentes⁵¹.

Preparação dos eluatos

Para a realização dos testes, foram utilizados extratos obtidos por meio da incubação dos corpos de prova em meio de cultura por dois períodos⁴². Para isso, os corpos de prova de cada material (n=18) foram divididos, aleatoriamente, nos 2 períodos de incubação estabelecidos, de 24 e 48 horas (n=9). A seguir, foram colocados, individualmente, em uma placa de 24 compartimentos, contendo 3 ml de meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM) e incubados a 37 °C

com 5% de CO₂ e 95% de ar por 24 ou 48 horas. Meio de cultura, sem corpos de prova, também foi incubado nas mesmas condições e serviu como controle.

Cultura celular

Neste estudo foi utilizada a linhagem de células imortalizadas, macrófagos RAW 264.7, cultivadas no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Brasil. As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL e 100 mg/mL de penicilina e estreptomicina, respectivamente, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, na temperatura de 37 °C. As células foram semeadas (1×10^6 cells/mL) em placas de cultura estéreis por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas por mais 24 horas aos eluatos dos materiais, obtidos nos períodos de 24 e 48 horas. Células incubadas em DMEM sem soro fetal bovino foram utilizadas como controle. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C até o início dos experimentos.

Teste de citocinas e quimiocinas

O Kit Mouse Cytokine Array Panel A (Proteome profiler™ array, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) foi utilizado para a análise de 40 citocinas que poderiam ser expressas pelas células RAW 264.7 quando em contato com os eluatos de 24 e 48 horas obtidos a partir dos 6 materiais testados. No início do experimento, as membranas foram cuidadosamente colocadas em contato com o tampão de

bloqueio (R&D Systems Inc.) por 1 hora, em agitador. Durante esse período, as amostras foram preparadas com a adição de 1 ml do sobrenadante de cada condição experimental e controle, 0.5 ml do tampão 4 (R&D Systems Inc.) e 15µl da solução de anticorpos para detecção das citocinas (R&D Systems Inc.), sendo incubadas por 1 hora. Após o período de incubação com o tampão de bloqueio, as membranas foram colocadas em contato com as amostras previamente preparadas e incubadas “overnight” em agitador a 2-8°C. Em seguida, as membranas foram submetidas aos procedimentos de lavagem recomendados e posteriormente expostas por 30 min a estreptavidina, novamente lavadas e colocadas em contato com os reagentes quimioluminescentes. A seguir, essas membranas foram envoltas em filme plástico e colocadas em um cassete para filme de raios-X por 8 minutos. Os sinais positivos de marcação das citocinas foram, então, identificados com a sobreposição de uma transparência que é a imagem matriz. As proteínas identificadas pelo kit tiveram suas expressões confirmadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA).

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes das células RAW 264.7, quando em contato com os eluatos 24 e 48 horas obtidos a partir dos 6 materiais, foram avaliados quanto a expressão de 7 citocinas/quimiocinas identificadas no teste anterior. São elas: TNF- α , IL-1 β , CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2 e CXCL4. Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (ELISA, R&D Systems, Inc , USA & Canada, Minneapolis,USA). Os anticorpos de captura (R&D Systems, Inc) foram diluídos em solução salina fosfatada (PBS), colocados em uma placa de 96 orifícios (Costar #

2592) e incubados “overnight”. Após esse período, o tampão de bloqueio (R&D Systems, Inc) foi colocado por, no mínimo, 1 hora. Para cada troca de solução, os orifícios da placa foram lavados com o tampão para lavagem (R&D Systems Catalog # WA126) de acordo com as instruções do fabricante, tomando-se o cuidado para que todo tampão de lavagem fosse removido. Após o tampão de lavagem, 100 µl das amostras a serem testadas e dos padrões de cada citocina/quimiocina foram colocados em cada orifício da placa e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. A seguir, 100 µl do anticorpo de detecção foram colocados e a placa incubada por mais 2 horas. A streptavidina foi colocada por 20 minutos e, em seguida, a solução de substrato (R&D Systems Catalog # DY999) foi adicionada por mais 20 minutos, na ausência de luz. Solução de parada (R&D Systems Catalog # DY994) foi utilizada logo após os 20 minutos e a absorbância foi mensurada, imediatamente, nos comprimentos de onda de 450 e 540 nm. Os experimentos foram realizados em pelo menos 2 ocasiões distintas.

Os filmes radiográficos foram scaneados e a densidade das imagens analisadas com o software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para cada imagem foram feitas duas mensurações, obtendo-se, posteriormente, a média. Em seguida, foi calculada a porcentagem das citocinas expressas em relação ao controle (células RAW 264.7 em meio de cultura sem eluatos). Para os resultados das células em contato com os eluatos de 24 e de 48 horas, foi detectada a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α), da citocina IL-1 β e de 5 quimiocinas, responsáveis por

recrutar outras células inflamatórias (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2 e CXCL4). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

As citocinas e quimiocinas identificadas nas análises realizadas com o Kit Mouse Cytokine Array Panel A, foram, então, quantificadas por meio de testes de ELISA. Nesses testes, para cada uma dos 7 mediadores inflamatórios avaliados, curvas de calibração foram criadas utilizando-se o software Readerfit (Hitachi Solutions America Ltd.), capaz de gerar curvas (*four parameter logistic (4-PL) curve-fit*), e as concentrações (pg/mL) de cada mediador em cada amostra foram, então, calculadas. Os valores transformados em picogramas por mL foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente foram submetidos a análises estatísticas de dois fatores, seguidas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. O software utilizado para as análises estatísticas foi o SPSS v.17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

Resultados

Para as análises realizadas com o Kit Mouse Cytokine Array Panel A, foram obtidas películas radiográficas com os sinais expressão de cada citocina. A Figura 1 ilustra um exemplo de película obtida durante os experimentos com o kit.

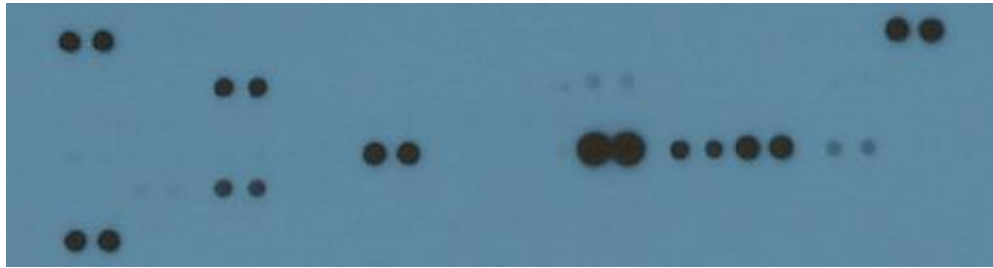


Figura 1. Película radiográfica obtida após contato das células RAW 264,7 com o eluato de 24 horas do material Ufi Gel P.

As médias e desvios padrão obtidos para cada um dos 7 mediadores inflamatórios avaliados estão apresentados no gráficos 1 a 7. O gráfico 1 mostra que para os eluatos de 24 horas, houve aumento significativo na produção $\text{TNF-}\alpha$ causada pelo material Ufi Gel P e diminuição significativa para o material Coe Comfort. Para os eluatos de 48 horas, foram observados valores significativamente maiores que o controle para os materiais Sofreliner, Trusoft e Coe Comfort. Os resultados mostraram aumento significativo na produção do $\text{IL-1}\beta$ em relação ao controle, somente após exposição aos eluatos de 24 horas dos materiais Ufi Gel P e Sofreliner (Gráfico 2). A análise do gráfico 3 mostra que os eluatos de 24 horas de todos os materiais causaram uma diminuição significativa na produção da quimiocina CCL2, tendo sido os efeitos mais acentuados para os materiais Durabase Soft, Coe Comfort e Softone. Para os eluatos de 48 horas, esses três materiais também causaram redução nas concentrações de CCL2, bem como o Trusoft, em menor magnitude, porém sem significância estatística em relação ao controle. Após a exposição aos eluatos de 24 horas de todos os materiais, os macrófagos RAW 264.7 produziram menores

concentrações da quimiocina CCL3 em relação ao controle (Gráfico 4). A produção foi aumentada significativamente pelos eluatos de 48 horas, obtidos a partir dos materiais Ufi Gel P, Sofreliner e Durabase Soft. O gráfico 5 mostra que a quimiocina CCL5 teve sua produção reduzida após a exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos dos materiais Trusoft, Durabase Soft, Coe Comfort e Softone. O mesmo efeito foi observado para os eluatos de 48 horas obtidos a partir desses materiais, quando comparados com o controle de 48 horas. Para a CXCL2, foi observado que o eluato de 24 horas do material Trusoft resultou aumento significativo dessa quimiocina e, para os eluatos de 48 horas, as concentrações obtidas para todos os materiais foram menores que as do controle, sem, no entanto, significância estatística (Gráfico 6). Os resultados para a quimiocina CXCL4 mostraram que os valores obtidos para os eluatos de 24 e de 48 horas do material Trusoft apresentaram-se abaixo do menor valor da curva padrão e, dessa forma, esses valores não foram incluídos na análise estatística. Para os demais materiais, o gráfico 7 mostra que as concentrações de CXCL4 obtidas para os eluatos de 24 horas não foram estatisticamente diferentes do controle. Já para o período de 48 horas, houve redução significativa na produção dessa quimiocina para os materiais Ufi Gel P e Coe Comfort.

Discussão

Respostas inflamatórias dos tecidos orais aos materiais reembasadores resilientes têm sido relatadas na literatura ^{27,35,60}. Assim, para simular melhor as condições clínicas, testes que avaliem outras funções celulares além daquelas

usualmente analisadas, como metabolismo e proliferação^{15, 19, 42, 44}, podem contribuir com informações importantes sobre esses materiais. Além disso, quantificar e conhecer os perfis das citocinas locais são essenciais para se obter conhecimento dos processos imunológicos e patológicos envolvidos nas reações inflamatórias. Dessa forma, neste estudo *in vitro*, a produção de diferentes mediadores inflamatórios por macrófagos expostos a eluatos obtidos a partir de materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos, frequentemente empregados em áreas de reparo e cicatrização, foi avaliada, para um melhor entendimento da capacidade pró-inflamatória desses materiais.

Nos processos inflamatórios, várias células do sistema imunológico são recrutadas para o local da lesão ou da infecção e podem iniciar a resposta inflamatória. Dentre essas, os macrófagos, presentes em todo o corpo, incluindo os tecidos orais, destacam-se como importantes células de defesa envolvidas na inflamação e apresentação de antígenos durante reação contra a invasão microbiana e substâncias externas e potencialmente prejudiciais²⁴, além de sua atuação em funções biológicas como o reparo de ferimentos e a remoção de células remanescentes após lesões ou infecções. Assim, no presente estudo, foram selecionadas as células Raw 264.7, de linhagem imortalizada, que retêm a maioria das funções dos macrófagos de cultura primárias¹ e são sensíveis a monômeros e plastificantes que podem ser liberados por materiais poliméricos^{1,24,36}, como os reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos.

Os resultados obtidos nos testes preliminares com o Kit Mouse Cytokine Array Panel A demonstraram a produção de mediadores inflamatórios pelos macrófagos RAW 264.7 após a exposição das células aos eluatos de 24 e de 48 horas obtidos a partir dos materiais. A quantificação desses mediadores, por meio de testes de ELISA, evidenciou que a produção do fator de necrose tumoral TNF- α foi, em geral, aumentada pelos materiais, principalmente para os eluatos de 48 horas. Os aumentos variaram, aproximadamente, de 33 a 78%. A única exceção, foi o material Coe Comfort, cujo eluato de 24 horas proporcionou redução do TNF- α em 70%. Para a citocina IL-1 β , a exposição aos eluatos de 24 horas dos reembasadores resilientes à base de silicone Sofreliner e Ufi Gel P, resultaram em valores 2 e 4 vezes maiores que o controle, respectivamente. Fator de necrose tumoral (TNF) é a denominação atribuída a um grupo de citocinas que possuem importantes propriedades antitumorais e reguladoras da imunidade, com dois membros distintos: TNF- α e TNF- β . O TNF- α inicialmente denominado como caquetina ², é uma molécula ubíqua produzida por grande variedade de células em diferentes tecidos, sendo um regulador significativo de apoptose e uma importante citocina pró-inflamatória com ações pleiotróficas ou seja, possui múltiplas funções ⁵⁴. O TNF- α apresenta a capacidade de induzir a produção de diversas substâncias como citocinas, (IL-1 β e IL-6, por exemplo), quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas que apresentam a função de ativar a imunidade inata. Além disso, o TNF- α pode estimular, significativamente a reabsorção óssea local por induzir a osteoclastogênese e influenciar a produção de

fatores essenciais para a diferenciação osteoclástica, como o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B e seu receptor (RANK) e a proteína osteoprotegerina ⁴. Sabe-se que a regulação do TNF- α é crítica para a homeostase celular e para que o hospedeiro apresente uma resposta imunológica efetiva ¹. O TNF- α apresenta-se elevado em certas condições patogênicas e possui o potencial tóxico que resulta em reações de hipersensibilidade com inflamação crônica ⁵⁰. Outra citocina responsável por vários processos incluindo a defesa do hospedeiro, inflamação e respostas a injúrias é a IL-1 ¹⁸, uma citocina multifuncional que é produzida por muitos tipos celulares, predominantemente macrófagos ⁵⁰. A liberação das citocinas IL-1 β e IL-6 pode ativar macrófagos durante infecção, injúria e inflamação ¹⁸. Também existem duas formas de interleucina IL-1, sendo a IL-1 β um agente mais potente apresentando efeito catabólico sobre o tecido ósseo 10 vezes maior que a IL-1 α e tem sido observado que os níveis de IL-1 β são maiores no sulco crevicular gengival em pacientes com doença periodontal. Assim, aumento na produção de TNF- α , o principal mediador pró-inflamatório liberado pelos macrófagos ^{8,11}, e da interleucina IL-1 β , como verificado no presente estudo para alguns dos materiais avaliados, são indicativos de resposta pró-inflamatória pelas células.

As quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular (8-17 Kd) com atividade quimiotática, que participam ativamente nos processos inflamatórios e de reparação tecidual ³⁴. A CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1 α) e CCL4 (MIP-1 β) são β quimiocinas produzidas por células, tanto da imunidade inata como adquirida:

macrófagos, células dendríticas, células NK, células T $\gamma\delta$ e linfócitos T CD8+ ⁹. A família mais diversa e numerosa de quimiocinas é a CC ²⁵, que pode ser subdividida em quimiocinas constitutivas e induzidas. Tem sido relatado que as quimiocinas CC constitutivas participam dos processos habituais de migração leucocitária; por outro lado, as quimiocinas CC induzidas regulam o recrutamento leucocitário em resposta a sinais imunológicos, inflamatórios e infecciosos. Dentre essas quimiocinas, a proteína quimiotática para monócito – 1 (CCL2/MCP1), por meio de sua ligação com seu receptor CCR2, contribui, significativamente, para processos inflamatórios. Kim et al.¹⁶ em estudo in vitro, demonstraram que CCL2, CCL5 e CXCL quimiocina ligante 12 (CXCL)12 estão envolvidas na diferenciação dos osteoclastos humanos a partir de precursores de osteoclastos ¹⁶. Pré-osteoclastos expressam os receptores CCR2 e CCR5 e respondem às quimiocinas ligantes, tais como CCL2, CCL3 e CXCL12 ⁴⁸. As quimiocinas CXCL, como a CXCL1, CXCL2 e CXCL3, estão envolvidas com diversos processos biológicos como quimiotaxia, respostas inflamatórias e imunológicas e ativação de receptores acoplados à proteína G, expressos na superfície celular ³⁸. O aumento imediato na expressão/função das quimiocinas e seus receptores é essencial para gerar o rápido influxo de leucócitos para o local da injúria ou infecção. Entretanto, o influxo deve ser, necessariamente, transitório para se evitar acúmulo de leucócitos que pode levar a resposta inflamatória persistente podendo resultar em danos aos tecidos e inflamação crônica ³⁷. No presente estudo, a produção das quimiocinas avaliadas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2 e CXCL4) foi, em geral, reduzida após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e de 48 horas

obtidos a partir dos materiais. Para a quimiocina CXCL4, por exemplo, os valores obtidos para os eluatos de 24 e de 48 horas do material Trusoft apresentaram-se abaixo do menor valor da curva padrão. Tem sido relatado que a redução na produção de mediadores inflamatórios pode ser um indicativo de que as células se apresentam com alterações significativas que interferem com as funções celulares normais, como por exemplo, a produção basal dessas substâncias ^{1,24}.

Estudos realizados com monômeros utilizados em materiais odontológicos, como o BisGMA, verificaram um aumento dos níveis de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 ²⁰. A exposição de fibroblastos gengivais humanos a eluatos de 72 horas obtidos a partir de um material para restaurações provisórias, quimicamente ativado e à base de PEMA, também resultou em expressão do fator TNF- α significativamente maior que o controle ²³. Da mesma forma, tem sido demonstrado que os monômeros HEMA bem como o sub-produto de degradação de monômeros metacrilatos, o ácido metacrílico (MAA) estimularam macrófagos (RAW 264.7) para a liberação de TNF- α ⁵⁹. Noda et al. ³⁹ observaram que, embora a exposição de células THP-1 (monócitos) a doses sub-letais de HEMA e TEGDMA, por períodos mais longos (2 semanas) não tenha ativado a secreção de TNF- α , foi observado que esses monômeros podem ter influência na produção dessa citocina quando as células são expostas, posteriormente, a toxinas bacterianas. Assim, os autores concluíram que baixas concentrações de componentes liberados por materiais odontológicos, como monômeros, podem representar um risco à resposta inflamatória normal, mesmo quando nenhuma alteração imediata aparente na função celular for detectada. Moharamzadeh et al. ²⁹

utilizado um modelo de mucosa oral 3D, também verificaram que a exposição à resina composta contendo o monômero TEGDMA aumentou, significativamente, a quantidade de IL-1 β liberada a partir do tecido. Outros estudos observaram que resinas odontológicas e monômeros como o BisGMA, também podem induzir a produção das citocinas IL-1 β e IL-6 em macrófagos RAW 264.7^{1,21}. Os efeitos foram dependentes do tempo de contato e da concentração do monômero²¹. Já os resultados do estudo de Nishioka et al.³⁸ mostraram que a exposição de macrófagos (THP-1) por 3 a 5 horas ao Di-(2-etilhexil) ftalato induziu a liberação de várias citocinas incluindo, TNF- α e IL-1 β , bem como a expressão de diversos genes relacionados a quimiocinas, entre elas as CXCL1, CXCL2 e CCL3. Segundo os autores³⁸, a produção de citocinas induzida pelo Di-(2-etilhexil) ftalato em macrófagos pode exacerbar as respostas inflamatórias. Além disso, o Di-(2-etilhexil) ftalato também induziu a expressão de genes de várias quimiocinas que atraem neutrófilos, sugerindo que esse plastificante promove reações inflamatórias por induzir os macrófagos a atrair quimicamente (quimiotaxia) os neutrófilos para os tecidos e pode estar envolvido no desenvolvimento de doenças alérgicas. Krüger et al.¹⁸ avaliaram o efeito de alguns plastificantes como di-n-butil ftalato (DBP), benzil butil ftalato (BBP), di-2-etilhexil ftalato (DEHP), diisododecil ftalato (DIDP), di-n-octil (DnOP), e di-isononil ftalato (DINP) na secreção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, e IL-8) por células endoteliais de córnea humana (B4G12). A exposição ao DBP, em concentrações que não afetaram a viabilidade celular, resultou em expressão

aumentada do mRNA para IL-1 β e IL-8 comparada com o controle. Embora a secreção das citocinas IL-1 β e IL-6 tenha ocorrido em baixos níveis após a exposição ao DBP, uma tendência para secreção aumentada das duas proteínas foi observada. Todos esses resultados, quando avaliados em conjunto, parecem indicar que os monômeros e plastificantes ftalatos podem ativar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em macrófagos e tem o potencial de causar distúrbios no processo complexo de regulação de uma resposta celular apropriada do sistema imune. A produção desregulada dessas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pode levar ao aumento da resposta imune, que pode ser, parcialmente, responsável pela destruição dos tecidos. Assim, podemos supor que as alterações observadas no presente estudo com relação à produção dos mediadores inflamatórios avaliados podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com os monômeros e plastificantes, presentes na composição de alguns dos materiais avaliados (Tabela 1), e que podem ser liberados para a cavidade oral, mesmo após a reação de polimerização/geleificação^{5,6,7,12,31,32,49}.

Os resultados de estudos *in vitro*, por serem obtidos em condições diferentes daquelas encontradas *in vivo*, não podem ser relacionados, diretamente, com as condições clínicas. De qualquer forma, este estudo demonstrou, pela primeira vez, que os materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos apresentam efeitos, em menor ou maior grau, na produção de citocinas e quimiocinas importantes na regulação dos processos inflamatórios e de cicatrização tecidual. Alterações nos níveis desses mediadores inflamatórios podem indicar respostas iniciais dos tecidos

diferentes da toxicidade aguda e, dessa forma podem servir como indicadores de efeitos biológicos adversos dos materiais utilizados no reembasamento de bases de próteses removíveis. Além disso, tem sido observado que algumas substâncias quimioatraentes, como a CCL5, também levam a ativação das integrinas⁵⁷, moléculas presentes por toda a membrana celular e que apresentam papel importante nos processos de adesão e migração celular, mediando a comunicação entre células e entre células e matriz extracelular. Assim, estudos estão sendo conduzidos para se avaliar o efeito de materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos sobre a expressão de integrinas.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the following agencies for funding of this work: FAPESP (grant numbers - 2010/08750-0, 2010/11764-3, 2012/07994-9), CAPES and CNPq (grant number - 302543/2010-4).

Referências Bibliográficas

1. Bailey LO, Weir MD, Washburn NR. "Quantification of macrophage viability and inflammatory response to dental bonding resins." *J Bioactive Compatible Polymers* 2006; 21(3): 185-206.
2. Beulter B, Cerami A. The biology of cachectin/TN -- a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 625-55.
3. Bilhan H, Geckili O, Bural C, Sonmez E, Guven E. Prosthetic rehabilitation of a patient after surgical reconstruction of the maxilla: a clinical report. *J Prosthodont* 2011; 20(1): 74-8.

4. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell Ir, Schwarz Em, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med.* 2005; 54(3): 127-31.
5. Brożek R, Koczorowski R, Rogalewicz R, Voelkel A, Czarnecka B, Nicholson JW. Effect of denture cleansers on chemical and mechanical behavior of selected soft lining materials. *Dent Mater.* 2011; 27(3): 281-90.
6. Brożek R, Rogalewicz R, Koczorowski R, Voelkel A. The influence of denture cleansers on the release of organic compounds from soft lining materials. *J Environ Monit.* 2008; 10: 770-4.
7. Cazacu M, Racles C, Vlad A, Antohe M, Forna N. Silicone-based composite for relining of removable dental prosthesis. *J Compos Mater.* 2009; 43(14): 2045-55.
8. Daly PM. Macrophages in vitro as a predictive model in polymer toxicology. Thesis. Doctor of Philosophy. The University of Edinburgh-School of Medicine and Veterinary Medicine 2008.
9. DeVico AL, Gallo RC. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 401-13.
10. Glim JE, Niessen FB, Everts V, van Egmond M, Beelen RHJ. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha- smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts. *Immunobiology* 2010; doi:10.1016/j.imbio.2012.10.004
11. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol.* 2007; 37: S9-17.

12. Graham BS, Jones DW, Sutow EJ. An in vivo and in vitro study of the loss of plasticizer from soft polymer gel materials. *J Dent Res.* 1991;70(5): 870-3.
13. Goren I, Allmann N, Yogev N, Schurmann C, Linke A, Holdener M, et al. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol.* 2009; 175(1): 132-47.
14. Hong G, Maeda T, Li Y, Sadamori S, Hamada T, Murata H. Effect of PMMA polymer on the dynamic viscoelasticity and plasticizer leachability of PEMA-based tissue conditioners. *Dent Mater J.* 2010; 29(4): 374-80.
15. Kanie T, Tomita K, Tokuda M, Arikawa H, Fujii K, Ban S. Mechanical properties and cytotoxicity of experimental soft lining materials based on urethane acrylate oligomers. *Dent Mater J.* 2009; 28(4): 501-6.
16. Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NA. MCP-1 induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption. *J Biol Chem.* 2006; 281(2): 1274-85.
17. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(9): 703-18.
18. Krüger T, Cao Y, Kjærgaard SK, Knudsen LE, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4G12. *Int J Toxicol.* 2012; 31(4): 364-71.

. In vitro

ispitivanje potencijalne toksicnosti oralno tkivnih kondicionera. *Hem Ind.* 2011; 65(6): 697-706.

20. Kuan Y-H, Huang F-M, Li Y-C, Chang Y-C. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF κ B activation via PI3K/Akt pathway. *Food and Chemical Toxicology.* 2012; 50: 4003-9.

21. Kuan Y-H, Li Y-C, Huang F-M, Chang Y-C. The upregulation of tumour necrosis factor- α and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A- glycidyl-methacrylate. *Int Endod J.* 2012; 45(7): 619-26.

22. Kumamoto 2001 Chemokine classification. <http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>. Internet Communication.

23. Labban N, Song F, Al-Shibani N, Windsor LJ. Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblast cytokine/growth factor expression. *J Prosthet Dent* 2008; 100(5): 390-7.

24. Lin NJ, Bailey LAO, Becker ML, Washburn N R, Henderson LA. Macrophage response to methacrylate conversion using a gradient approach. *Acta Biomaterialia* 2007; 3(2): 163-73.

25. Locati M, Otero K, Schioppa T, Signorelli P, Perrier P, Baviera S, et al. The chemokine system, tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy* 2002; 57(11): 972-82.

26. Mack, PJ. Denture soft lining materials: clinical indications. *Austr Dent J.* 1989; 34(5): 454-8.

27. Marín Zuluaga DJ, Gómez Velandia OC, Rueda Clauijo DM. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. *Gerodontology*. 2011; 28(4): 258-63.
28. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol*. 2009; 175(6): 2454-62.
29. Moharamzadeh K, Brook IM, Scutt AM, Thornhill MH, Van Noort R. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. *J Dent*. 2008; 36(5): 331-6.
30. Mortier A, Van Damme J, Proost P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunology Letters*. 2012; 145(1-2): 2-9.
31. Munksgaard EC. Leaching of plasticizers from temporary denture soft lining materials. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(1):101-4.
32. Munksgaard EC. Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(2): 166-9.
33. Murata H, Hamada T, Sadamori S. Relationship between viscoelastic properties of soft denture liners and clinical efficacy. *Jpn Dent Sci Rev*. 2008; 44(2):128-32.
34. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; 95(10): 3032-43.
35. Mutluay MM, Oguz S, Fløystrand F, Saxegaard E, Dogan A, Bek B, et al. A prospective study on the clinical performance of polysiloxane soft liners: one-year results. *Dent Mater J*. 2008; 27(3):440-7.

36. Naarala J, Korpi A. Cell death and production of reactive oxygen species by murine macrophages after short term exposure to phthalates. *Toxicol Lett.* 2009; 188(2):157-60.
37. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-52.
38. Nishioka J, Iwahara C, Kawasaki M, Yoshizaki F, Nakayama H, Takamori K, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces production of inflammatory molecules in human macrophages. *Inflamm Res.* 2012; 61(1): 69-78.
39. Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H. Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF-alpha secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater.* 2003; 19(2): 101-5.
40. Oppenheim JJ. Cytokines: Past, Present, and Future. *Int J Hematol.* 2001; 74(1): 3-8.
41. Ortegon SM, Martin JW, Lewin JS. A hollow delayed surgical obturator for a bilateral subtotal maxillectomy patient: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 2008; 99(1): 14-8.
42. Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90(1):82-6.
43. Paniz G, Chierico A, Tomasi P, Cuel S. A technique for immediate occlusal implant loading of a completely edentulous mandible: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 2012; 107(4): 221-6.

44. Park SK, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Changes in properties of short-term-use soft liners after thermocycling. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(7):717-24.
45. Popa C, Netea MG, Van Riel PLCM, Van Der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007; 48(4): 751-62.
46. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49:35-43.
47. Saitoh S, Sasaki K, Nezu T, Taira M. Viscoelastic behavior of commercially available tissue conditioners under compression. *Dent Mat J* 2010;29:461-468.
48. Silva TA, Garlet GP, Fukuda SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86:306-319.
49. Sofou A, Tsoupi I, Karayannis M, Owall B. Determination of residual monomers released from soft lining materials with the use of HPLC. *Pak J Anal Environ Chem.* 2007; 8(1): 41-52.
50. Soromou LW, Zhang Z, Li R, Chen N, Guo W, Huo M, et al. Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-O-methyl-naringenin. *Molecules.* 2012; 22; 17(3):3574-85.
51. Tay L, Herrera DR, Quishida CCC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology* 2012; 29(2): e275–e80.

52. Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(6): 607-18.
53. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(6): 507-13.
54. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-53.
55. Vervaeke S, Dierens M, Besseler J, De Bruyn H. The influence of initial soft tissue thickness on peri-implant bone remodeling. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012 [Epub ahead of print]
56. Wang Q-S, Cui Y-L, Dong T-J, Zhang X-F, Lin K-M. Ethanol extract from a Chinese herbal formula, "Zuojin Pill", inhibit the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 141(1): 377-85.
57. Weber C, Katayama J, Springer T.A. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(30):10939-44.
58. Wells CA, Ravasi T, Hume DA. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *J Leukoc Biol*. 2005; 78(1): 9-13.

59. Yourtee DM, Tong PY, Eick JD, Zhuang WC, Cobb C, Bean TA, Kostoryz EL. *In situ* hybridization test for TNF- α : A simplified approach to conforming induction of the cytokines by biomaterials. *In Vitro Toxicol.* 1997;10 : 245-51.
60. Zaki HS, Ketzan KJ, Carrau RL. Hypersensitivity to temporary soft denture liners: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 1995; 73(1):1-3.
61. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines, a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-127.

Table 1 - Materials evaluated in this study.

Product	Type	Manufacturer	Powder/Liquid ratio	Composition	Batch number	Polymerization/gelation time at room temperature
Durabase Soft	Plasticized acrylic resin soft liner	Reliance Dental MFG Co., III., USA	1g/0.83 mL	Powder – PEMA and benzoyl peroxide Liquid – MMA and DBP	29549	15 min
Trusoft	Plasticized acrylic resin soft liner	Bosworth Co, Skokie, IL, USA	1.06g/1.15mL	Powder – PEMA Liquid – Benzyl butyl phthalate (plasticizer) and ethyl alcohol	0904-137	6 min
Ufi Gel P	Silicone-based soft liner	Voco, Germany	Cuxhaven, Base and catalyst in a 1:1 ratio	Base – Modified Polydimethylsiloxane (A-silicone) Catalyst- platinum catalyst	1009051	10 min
Sofreliner S	Silicone-based soft liner	Tokuyama Corp., Tokyo, Japan	Dental Auto-dispensing system	Polyorganosiloxane Silicone resin powder Silica, amorphous	035E50	5 min
Softone	Tissue conditioner	Bosworth Co, Skokie, IL, USA	1.03g/1.1mL	Powder – PEMA Liquid – DPB and etanol	0906-231	8 min
Coe Comfort	Tissue conditioner	GC America Inc, Alsip, IL, USA	1g/0.83 mL	Powder – PEMA and zinc undecylenate Liquid – Benzyl Benzoate, cotton seed oil, ethanol, acetyl tributyl citrate, methyl salicylate, and peppermint oil	1006032	10 min

PEMA, poly (ethyl methacrylate); MMA, methyl methacrylate; DBP, di-butyl phthalate.

Tabela 2 Resultados (%) da expressão de citocinas e quimiocinas pelo Kit Proteome Assay para todos os materiais e períodos avaliados, em relação ao controle (100%).

Período de obtenção dos eluatoss	Material	Citocinas e quimiocinas						
		TNF- α	IL-1 β	CCL2	CCL3	CCL5	CXCL2	CXCL4
24 horas	Ufi Gel P	149,92	0	113,91	116,10	83,86	134,31	1,10
	Sofreliner S	137,36	0,83	93,33	134,43	76,46	230,23	1,42
	Trusoft	26,64	0	128,68	78,53	86,09	37,14	0
	Durabase Soft	0	0	47,02	98,61	24,23	113,09	0
	Coe Comfort	127,87	0	34,66	95,56	0	178,45	0
	Softone	0	0	0	98,15	0	112,57	0
48 horas	Ufi Gel P	67,46	0	94,71	136,69	0	87,18	105,66
	Sofreliner S	158,97	0	75,44	106,05	0,60	87,13	138,75
	Trusoft	150,46	0	104,88	134,21	0	102,69	149,42
	Durabase Soft	438,23	76,72	231,91	48,03	0	11,69	0
	Coe Comfort	311,54	0	45,75	118,47	0	112,30	0
	Softone	46,85	31,98	30,12	0	0	67,91	0

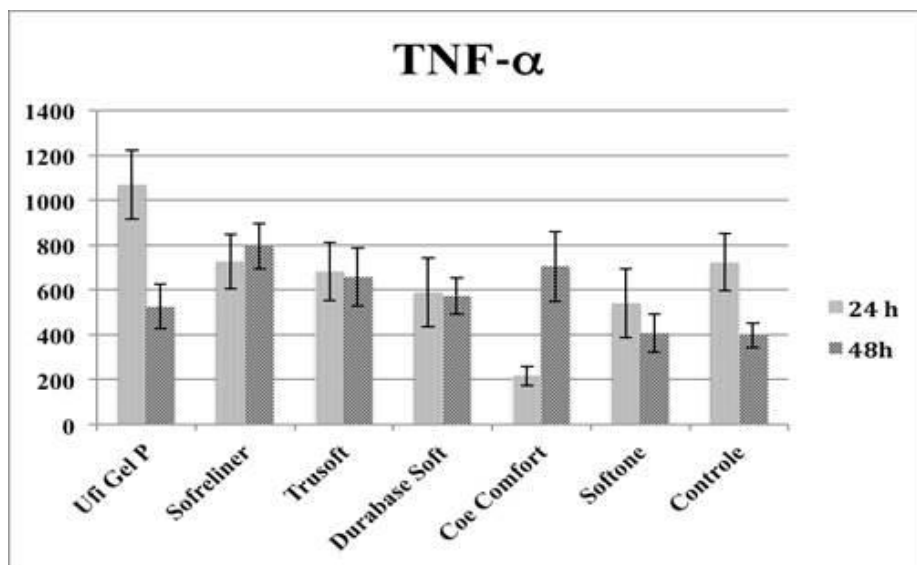


Gráfico 1 – Médias e desvio-padrão da citocina TNF- α após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e 48 horas, obtidos a partir de cada um dos materiais avaliados.

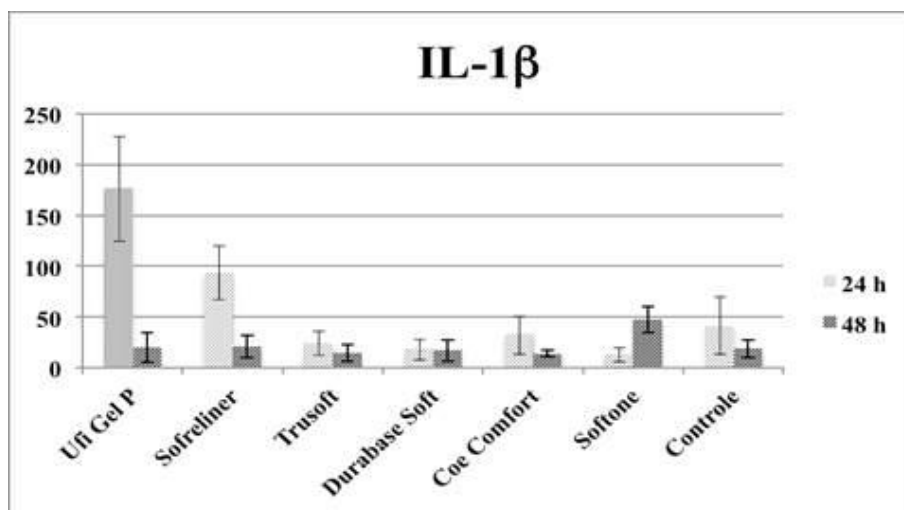


Gráfico 2 – Médias e desvio-padrão da citocina IL-1 β após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e 48 horas, obtidos a partir de cada um dos materiais avaliados.

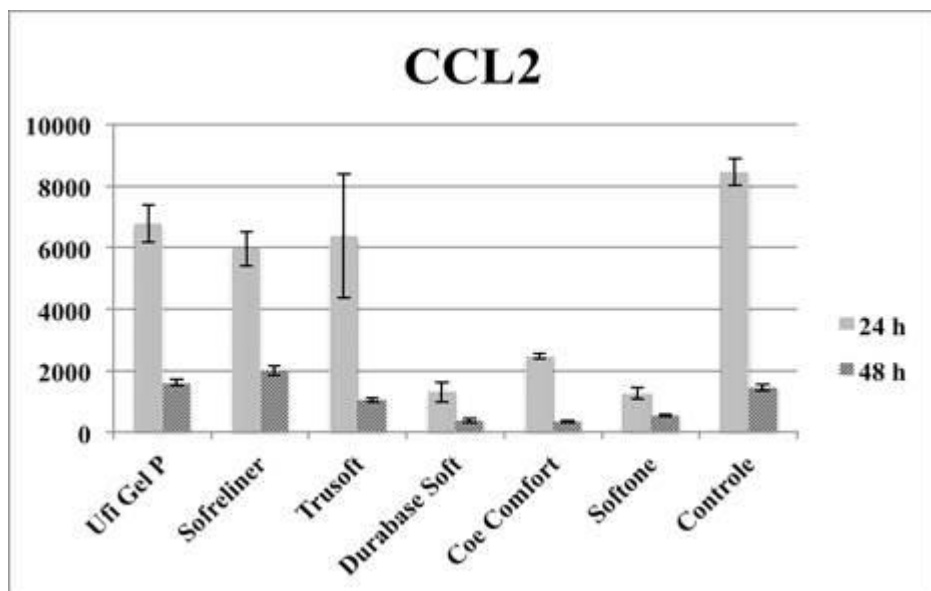


Gráfico 3 – Médias e desvio-padrão da quimiocina CCL2 após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e 48 horas, obtidos a partir de cada um dos materiais avaliados.

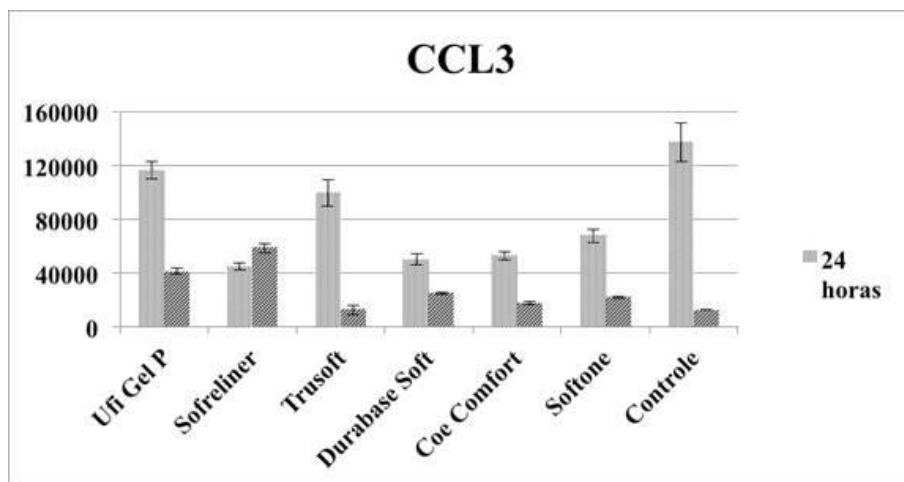


Gráfico 4 – Médias e desvio-padrão da quimiocina CCL3 após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e 48 horas, obtidos a partir de cada um dos materiais avaliados.

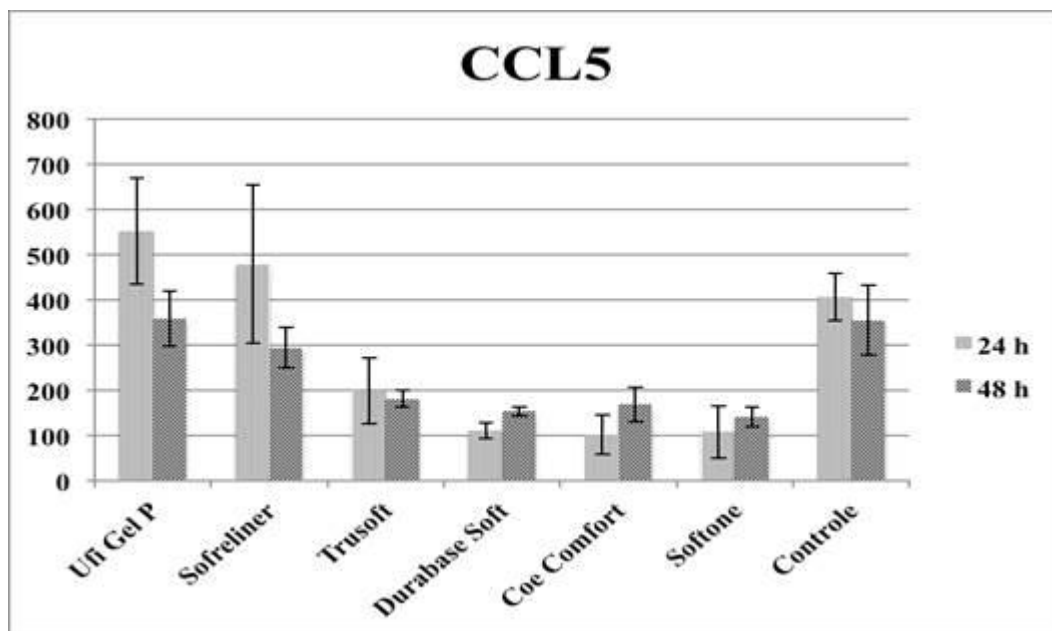


Gráfico 5 – Médias e desvio-padrão da quimiocina CCL5 após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e 48 horas, obtidos a partir de cada um dos materiais avaliados.

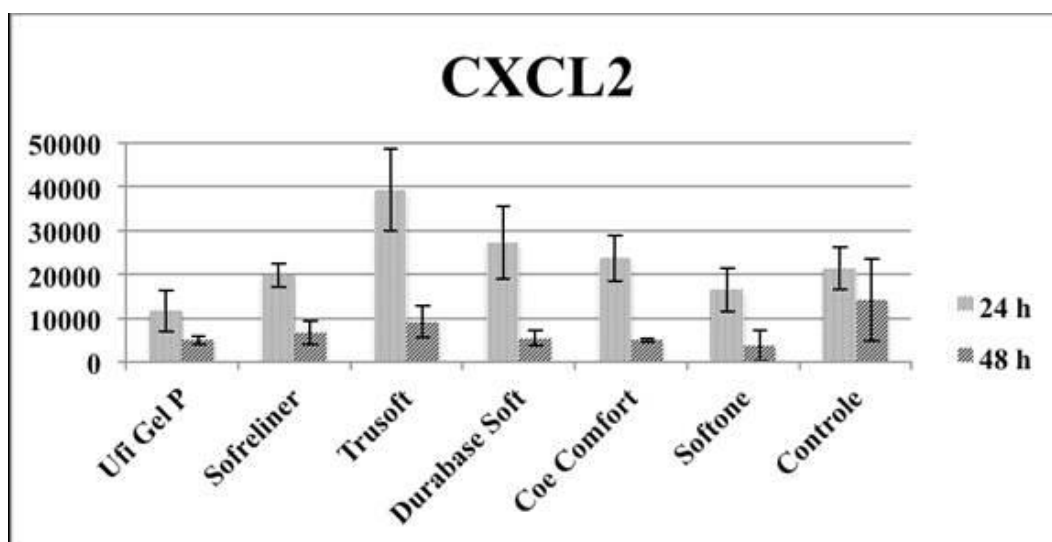


Gráfico 6 – Médias e desvio-padrão da quimiocina CXCL2 após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e 48 horas, obtidos a partir de cada um dos materiais avaliados.

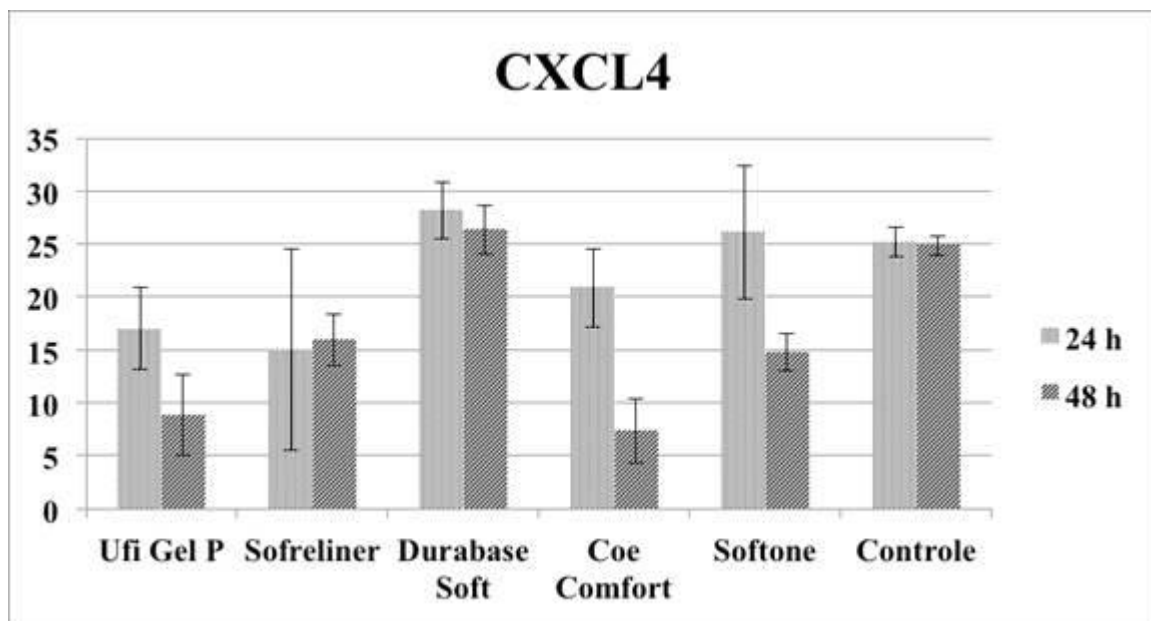


Gráfico 7 – Médias e desvio-padrão da quimiocina CXCL4 após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e 48 horas, obtidos a partir de cada um dos materiais avaliados.



Discussão

4 Discussão

4.1 Análise das resinas acrílicas para base de prótese pelo método de MTT e materiais reembasadores resilientes pelos métodos de MTT, MEV e Citometria de fluxo

No presente estudo, a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese foi avaliada por meio de um método baseado em cultura de células de linhagem imortalizada. Esse método é reprodutível e relativamente descomplicado, se comparado a outras modalidades¹⁰⁷. Além disso, seu grande uso para a avaliação de materiais odontológicos permite que resultados sejam confrontados com os de diversos estudos^{24,32,66,72,73,92,106,107,144,156,164}. Embora as células de cultura primária tenham um fenótipo e uma resposta mais próxima do que ocorre in vivo, o número de células obtidas é baixo e sua vida útil é limitada¹⁵⁶. Células de linhagem contínua, como a utilizada neste estudo (L929), são facilmente cultivadas, possibilitam resultados com boa reprodutibilidade e não apresentam a variação entre indivíduos doadores⁶⁶. Além disso, as células L929 são largamente utilizadas para avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos^{6,72,73,160} e recomendadas pela ISO para testes de citotoxicidade⁶⁸. Testes com fibroblastos simulam a situação clínica de quando ocorre a ulceração traumática do epitélio após a colocação da prótese. Nessas condições, os fibroblastos entram em contato direto com as resinas para base de prótese, materiais reembasadores ou substâncias liberadas por esses. Outra condição clínica, que ocorre a exposição desses materiais aos fibroblastos, é quando se realiza reembasamento de próteses sobre implantes com aplicação de carga imediata ou imediatamente após cirurgia de reabertura.

Para avaliar os efeitos biológicos dos polímeros utilizados na odontologia, alguns protocolos têm sido sugeridos.¹⁰⁷ Entre eles, o teste de contato direto, quando o material a ser testado interage diretamente com as células sem a colocação de nenhuma barreira entre eles^{14,91}, e também o teste com eluatos, quando as células são expostas a eluatos adquiridos dos materiais poliméricos^{6,60,66,72,73,}

^{92,141,144}. No presente estudo, os dois tipos de testes foram realizados e os resultados de ambos foram utilizados para complementar as informações sobre os efeitos tóxicos liberados pelos materiais para base de prótese e reembasadores resilientes, em cultura de células.

Vários métodos colorimétricos têm sido utilizados para avaliar a citotoxicidade de materiais, como o teste de MTT ^{6,66,72,90,106} que verifica a viabilidade celular por demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH) e, essa, corresponde à atividade mitocondrial da respiração celular¹¹¹. Esse é um teste rápido, objetivo, confiável e que não envolve incorporação de radioisótopos, os quais demandam equipamentos especiais e produzem lixo radioativo. Outro teste utilizado para a avaliação dos polímeros na odontologia é o azul de alamar. Além das vantagens também apresentadas para o teste de MTT, esse teste possui o benefício de ser não tóxico para as células e de não demandar a destruição celular para obtenção de resultados. Essa característica permite que as mesmas células sejam monitoradas durante um tempo^{49,70}. Os resultados desse método, entretanto, é diretamente proporcional à redução do reagente azul de alamar no meio de cultura e à quantidade/proliferação das células⁷⁰.

O efeito citotóxico das resinas acrílicas para base de prótese tem sido o foco de vários estudos, como mencionado na recente revisão da literatura³². No entanto, poucas estudos compararam a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas por banho de água, por luz^{66,106} ou energia de micro-ondas^{72,73,144}. Sendo assim, no presente estudo, foi realizada a análise da citotoxicidade de três resinas acrílicas para base de prótese, sendo duas polimerizadas por micro-ondas (Vipi Wave e Nature Cryl) e uma polimerizada por luz (Eclipse), pelo período de 24 hs. Os resultados dos eluatos de 24 hs dos materiais Vipi Wave, Nature Cryl e Eclipse, este testado com e sem barreira de ar, não reduziram a viabilidade celular quando comparados ao controle. Resultados similares foram encontrados para resinas polimerizadas por calor (banho de água) quando comparados aos obtidos pelas resinas polimerizadas com energia de micro-

ondas^{72,73,144}. O efeito do eluato de 24 hs dos materiais na viabilidade celular foi semelhante para todas as resinas testadas, com valores $>80\%$ ¹⁴⁴, sendo considerado como levemente ou não citotóxico^{66,72,73}. Huang et al.⁶⁶ (2001), realizaram um estudo para comparar três resinas para base de prótese com diferentes polimerizações, sendo elas: Lucitone 199 (polimerizada por banho de água), Rebase (autopolimerizável) e a Triad (fotopolimerizável). Foram obtidos eluatos desses materiais com 1, 3 e 5 dias. Os resultados demonstraram que as resinas acrílicas, sejam ativadas por luz ou banho de água, não tiveram efeitos citotóxicos diferentes entre si, sendo a viabilidade celular maior do que 75% ⁶⁶.

Diferentemente dos resultados obtidos com os eluatos, no presente estudo foi observada a redução na viabilidade celular quando os produtos foram testados em contato direto com as células L929. Por meio desse teste, foi detectada diferença entre os materiais. O efeito citotóxico das resinas acrílicas para base de prótese tem sido atribuído principalmente à liberação de monômero residual^{31,32,37,107}. Sabe-se, também, que as resinas acrílicas podem sofrer degradação provocada por oxidação, hidrólise e decomposição^{48,159}. Esses processos podem dar origem a produtos de degradação, como o ácido metacrílico (AM), por meio de hidrólise ou esterificação dos grupos metacrilato^{48,78} e ácido benzóico (AB), via decomposição do peróxido de benzoila (PB). O AM é um substrato fisiológico da via valina e é metabolizado em CO_2 por meio do metilmalonil e succinil-CoA, ambos substratos do ciclo do ácido cítrico⁶⁰. O AM, no entanto, pode induzir apoptose, além de interferir no ciclo e metabolismo celulares^{31,152}. Já foi demonstrado que a quantidade do AM liberada por materiais poliméricos, imersos em água, reduziu após curto período de tempo (3 hs)¹⁵⁹.

No que diz respeito ao AB, estudos têm demonstrado que esse composto não promove mudanças significativas na proliferação e metabolismo celulares^{31,38}, sendo significativamente menos tóxico do que o PB para os queratinócitos humanos RHEK-1⁹. Dessa forma, é provável que, durante o período de obtenção dos eluatos de 24 hs, a decomposição dos monômeros residuais liberados

pode ter ocorrido, dando origem a sub produtos. Esses, pelo menos em parte, devem ser o motivo pelo qual os eluatos de 24 hs obtidos pelos materiais Vipi Wave, Nature Cryl MC e Eclipse não causaram efeito tóxico para as células L929. No contato direto, entretanto, todos os materiais reduziram a viabilidade celular se comparados ao controle. Em um estudo recente⁴⁴, o metabolismo das células L929 foi avaliado após contato direto com três resinas acrílicas para base de prótese (GC Reline Hard, Futura Gen e Me-liodent), pelos períodos de 1h, 24hs e 1 semana. Os resultados mostraram que o metabolismo celular foi significativamente inferior no período de 1h, quando comparados a 24 hs ou após uma semana de contato.

A porcentagem de viabilidade celular após o contato direto das células L929 com a resina Eclipse, com ou sem barreira de ar, foi maior do que a resina Nature Cryl MC. Uma possível explicação para esses resultados é a composição dos materiais. A resina Eclipse contém o monômero dimetacrilato (UDMA), enquanto a Nature Cryl MC é composta pelo monômero monofuncional metil metacrilato (MMA). Danesh et al.³⁷(2012) avaliaram 3 resinas auto polimerizáveis e 3 polimerizadas por luz, no que diz respeito aos monômeros residuais remanescentes no material e sua liberação ao longo do tempo. Duas resinas polimerizadas por luz, baseadas no monômero UDMA, mostraram baixa liberação de monômeros residuais quando comparadas às resinas autopolimerizáveis, composta pelo monômero MMA. Isto é relacionado a características dos monômeros liberados e sua difusão. O monômero UDMA (peso molecular $> 450 \text{ g/mol}$)¹³², tem um baixo grau de mobilidade pela matriz polimérica quando comparada a moléculas pequenas, como o MMA (peso molecular $- 110.18 \text{ g/mol}$)¹⁵¹. Além disso, para os monômeros metacrílicos, como o MMA, a formação de ligações cruzadas ocorre em concentrações bem mais baixas do que em sistemas de dimetacrilato¹⁴⁹. Esses sistemas formam polímeros com alto grau de ligações cruzadas, que restringem a mobilidade do monômero residual, diminuindo assim sua liberação. Com os resultados do presente estudo, pode-se sugerir que, houve menos liberação de monômero UDMA pela resina Eclipse se comparada com o monômero MMA a partir

da resina Nature Cryl MC. Além disso, o tamanho e o formato do monômero, que é correlacionado ao peso molecular, também são importantes no efeito citotóxico, assim como no papel de penetrar na membrana celular¹³².

A resina Eclipse é comercializada com um revestimento que proporciona uma barreira entre a superfície do material e o oxigênio atmosférico, com a finalidade de permitir uma completa fotopolimerização na superfície da resina. Em estudos anteriores, verificou-se que a barreira de ar fornecida pelos fabricantes de duas resinas reembasadoras ativadas por luz era altamente tóxica para as células, inibindo quase totalmente a síntese das proteínas, DNA e RNA^{91,14}. No presente estudo, dois tipos de corpos de provas foram confeccionados para a realização dos testes: (1) a barreira de ar não foi aplicada, mas as superfícies foram cobertas por placas de vidro durante a polimerização, para evitar o contato com o oxigênio e a formação de uma camada não polimerizada. Essa camada não polimerizada pode diminuir as propriedades mecânicas dos materiais e liberar mais substâncias potencialmente citotóxicas^{92,168}; (2) aplicação do revestimento de barreira de ar nas superfícies dos corpos de prova durante a ativação da luz e essa barreira removida depois da polimerização. A finalidade da remoção da barreira de ar foi analisar se quaisquer restos dessa barreira na prótese podem ser potencialmente irritantes para os tecidos de suporte bucais. O efeito irritante não parece existir, já que o presente estudo não encontrou diferença significativa entre esses dois tipos de corpos de prova.

Para a realização dos efeitos citotóxicos dos materiais reembasadores resilientes em cultura celular, além das células L929, também foram utilizadas duas outras linhagens celulares: HaCaT e Macrófagos Raw 264.7. As células HaCaT são queratinócitos de pele humana, também de linhagem imortalizada, que são facilmente cultivadas, podendo ser utilizadas em passagens indefinidas, e que mantêm as características biológicas dos queratinócitos humanos¹⁰⁸. Além disso, as células L929 e HaCat, as quais são sensíveis a monômeros e plastificantes utilizados em materiais odontológicos^{63,108,156}, têm sido comumente utilizadas para estudos de citotoxicidade de diferentes materiais, incluindo resinas acrílicas e reembasadores

resilientes^{34,124,128,130,154}. As células Raw 264.7, também de linhagem imortalizada, foram utilizadas por reterem a maioria das funções dos macrófagos de cultura primárias¹², os quais constituem a primeira linha de defesa, protegendo o organismo contra substâncias externas e potencialmente prejudiciais. Essas células também são sensíveis a monômeros e plastificantes liberados por materiais poliméricos^{12,95,119}. Devido ao seu papel na patogênese da resposta inflamatória, essas células são relevantes para se testar a biocompatibilidade de materiais odontológicos¹⁵, particularmente materiais protéticos, os quais são comumente colocados em contato com áreas de tecidos ulcerados ou em fase de cicatrização^{42,115,162}.

Os resultados obtidos nos testes de viabilidade celular demonstraram que, em geral, os materiais não foram citotóxicos para as células L929, Raw 264.7 e HaCat, com exceção dos eluatos de 48 hs dos materiais Ufi Gel P, Coe Comfort e Softone, que causaram discreta toxicidade sobre as células HaCat (valores de viabilidade celular acima de 70%). Além disso, não foram detectadas diferenças significativas entre os materiais, para nenhuma das três linhagens celulares avaliadas. Alguns estudos que investigaram eluatos do material Ufi Gel P nos períodos de 24 hs¹⁵⁴, 48 hs¹³⁰ e 96 hs¹²⁸, aplicados em contato com as células L929, também não observaram menor viabilidade celular. Em um estudo recente,⁸¹ (2011) mostraram que a citotoxicidade dos reembasadores à base de silicone (GC Reline Soft e Ufi Gel P) foi menor que a dos materiais à base de resina acrílica (Lang Flexacryl, Lang Immediate, Vertex Soft e Trusoft). Além disso, para o material Ufi Gel P, as médias de viabilidade celular observadas no teste de MTT foram, em geral, menores que as do presente estudo, tendo variado de 50 a 80%. Esses resultados podem estar relacionados aos períodos mais longos para obtenção dos eluatos (até 30 dias) e, ainda, à linhagem celular (HeLa) utilizada pelos autores⁸¹.

A análise de possíveis alterações na morfologia celular vem sendo amplamente empregada na avaliação dos efeitos tóxicos de materiais odontológicos^{39,87}. De maneira geral, a não redução da viabilidade das células expostas a eluatos de materiais dentários não exclui a possibilidade de discretos danos

às delicadas estruturas celulares. Dessa forma, neste estudo, foram feitas análises da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura. As células L929 e HaCat expostas aos eluatos dos materiais experimentais apresentavam morfologia e espalhamento sobre as lamínulas de vidro semelhantes ao observado para o grupo controle. Por outro lado, as análises obtidas com as células RAW 264.7 evidenciaram que a morfologia celular não se encontrava bem definida, com imagens que evidenciavam resíduos de células letalmente danificadas, sobretudo após a exposição aos eluatos dos materiais Coe Comfort e Durabase Soft. A exposição das células L929 ao eluato de 48 hs do material Coe Comfort também alterou as células L929, que se apresentavam sem limite celular bem definido.

O tipo de morte celular, após exposição das células L929 e HaCat aos eluatos dos reembasadores resilientes, foi analisado por meio da citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que, para as células HaCat, não houve aumento significativo nas porcentagens de apoptose e necrose para nenhum dos materiais reembasadores avaliados, tanto para os eluatos de 24 hs como de 48 hs. Para as células L929, houve aumento nas taxas de apoptose para os reembasadores Ufi Gel P e Sofreliner S (eluato de 24 hs) e Durabase Soft (eluato de 48 hs) e, todos os materiais aumentaram as porcentagens de necrose (eluatos de 24 hs e 48 hs), exceção do reembasador resiliente Trusoft. A apoptose é um processo fisiológico ativo e programado de morte celular, que permite ao organismo eliminar células danificadas ou indesejadas, sem desencadear reações inflamatórias^{15,33,142}. Por outro lado, a necrose é um processo passivo de morte celular após sua exposição à injúria severa, que ocorre de forma não controlada, sem regulação genética, induzindo processos inflamatórios com sintomas clínicos^{33,57,142}. Tem sido sugerido que o padrão de morte celular pode ser importante em relação à evolução do potencial irritativo dos materiais odontológicos^{15,33}, tendo em vista que as células apoptóticas, removidas por fagocitose, desencadeiam discreto dano tecidual, diferente do que acontece nos casos de necrose celular³³. Assim, embora não tenham sido verificadas alterações significativas na viabilidade celular (Teste de MTT), os resultados da citometria de

fluxo sugerem que os efeitos dos eluatos dos materiais avaliados foram mais acentuados para as células L929 que para as células HaCat. Apesar disso, os resultados sugerem que as células remanescentes ainda se apresentaram em número suficiente para produzir atividade mitocondrial (formação do formazan) similar aquela determinada para as células controle (sem contato com os eluatos), sendo confirmado pelo teste de viabilidade celular.

A maioria dos estudos que avaliaram a citotoxicidade dos reembasadores resilientes realizaram testes utilizando os eluato obtidos dos materiais^{35,74,81,128,130}. Na presente pesquisa, os efeitos dos reembasadores resilientes sobre o metabolismo celular foram analisados não somente com os eluatos, mas também por meio do contato direto entre as células e os materiais. Esse último experimento foi estabelecido para complementar as informações obtidas nos testes realizados com os eluatos bem como para simular os procedimentos intra-orais de reembasamento das bases das próteses, nos quais as células são colocadas em contato direto com materiais recém polimerizados, sendo assim expostas às substâncias liberadas pelos reembasadores⁸. Em contraste com os resultados observados no teste dos eluatos, o contato direto entre os reembasadores resilientes e as células determinaram a ocorrência de diferenças significativas entre os materiais. Uma possível explicação para isto é que, durante os períodos de incubação das amostras em meio de cultura para obtenção dos eluatos, pode ter ocorrido a evaporação ou a decomposição das substâncias liberadas pelos materiais. Como resultado, nos testes de MTT realizados com os eluatos, não foram detectados efeitos citotóxicos severos ou diferenças significativas entre os materiais. Por outro lado, nos testes que utilizaram o contato direto entre os reembasadores e as células, a presença da amostra do material durante a realização dos testes pode ter prevenido a evaporação/decomposição dos componentes liberados¹ e, conseqüentemente, maiores alterações na viabilidade celular foram observadas. Os resultados mostraram que, nos dois períodos de contato direto avaliados (24 e 48 hs), os materiais à base de silicone - Ufi Gel P e Sofreliner S, foram menos citotóxicos para todas as células (L929,

HaCat e Raw 264.7); por outro lado, o reembasador à base de resina acrílica plastificada - Durabase Soft, apresentou efeitos mais acentuados, resultando em médias de porcentagens de viabilidade celular menores que 16%. Os condicionadores de tecidos - Coe Comfort e Softone também foram citotóxicos, sobretudo para as células RAW 264.7, reduzindo a viabilidade celular para taxas menores que 8%. O material Trusoft demonstrou citotoxicidade intermediária, não sendo estatisticamente diferente dos reembasadores à base de silicone para as células L929 e HaCat, enquanto para as células RAW 264.7 resultou em porcentagens menores de viabilidade celular (57,4% para 24 hs e 37,7% para 48 hs). Os reembasadores resilientes à base de silicone apresentam composição similar aos materiais para moldagem à base de polivinilsiloxano¹¹⁵. A reação desses materiais ocorre por adição, não envolvendo a formação de sub-produtos, tal como o álcool, que se forma nos silicones que reagem por condensação, sendo que esta característica contribui para sua natureza mais estável.

Sofou et al.¹⁴⁶(2007) avaliaram a liberação de componentes dos diversos materiais reembasadores e condicionadores de tecidos em diferentes meios de armazenamento e temperaturas. Os autores mostraram que os compostos ácido metacrílico, metil metacrilato e n-butil metacrilato eluíram em níveis baixos a partir dos materiais à base de silicone, como esperado. A liberação dos plastificantes ftálicos (dialil-ftalato, butoxi carbonil metil butil ftalato, dibutil ftalato, dioctil ftalato) também ocorreram em baixos níveis, especialmente para o material Ufi Gel P. Da mesma forma, Brozek et al.²² (2011) verificaram que, embora componentes tenham sido liberados pelos materiais reembasadores resilientes avaliados, incluindo monômeros (etileno glicol dimetacrilato, metil metacrilato e dodecil metacrilato), de maneira geral, os materiais à base de silicone foram mais estáveis que aqueles à base de resina plastificada, liberando menores quantidades. Assim, pode-se sugerir que os efeitos citotóxicos menos acentuados observados no presente estudo para os materiais Ufi Gel P e Sofreliner S estejam relacionados com menor liberação de componentes residuais.

O reembasador à base de resina acrílica plastificada Durabase Soft é composto por um pó à base de polietil metacrilato (PEMA) e PB, uma molécula que atua como gerador de radicais livres e é utilizada como iniciador da reação de polimerização dos materiais poliméricos^{10,38}. Os radicais livres, entre eles as espécies reativas de oxigênio (EROS), são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados, o que faz com que essas moléculas sejam instáveis e apresentem, como uma de suas características, a meia vida curta e alta interação com todas as moléculas biológicas (lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos), podendo causar injúrias às células¹⁰. Os radicais livres gerados pela decomposição do PB durante a reação de polimerização levam ao estresse e colocam as células sob condições tóxicas⁴, sendo que células expostas aos materiais poliméricos também produzem radicais livres⁴. Assim, provavelmente, o efeito tóxico do PB é mediado pelos seus radicais livres derivativos, cuja formação envolve a quebra da ligação peróxido na molécula do PB para formar tantos radicais benzoiloxil, que podem se fragmentar para formar dióxido de carbono e radicais fenílicos, como o produto final e estável da degradação, que é o AB^{10,38}. Estudos têm demonstrado que o PB pode influir no metabolismo de lipídeos e afetar a viabilidade³⁸, o crescimento e a proliferação celular, com danos irreversíveis dependendo da concentração, e ainda, o aumento na multinucleação e intensa vacuolização das células¹⁰. Além disso, Babich¹⁰ (1996) verificou que o PB foi aproximadamente 10 vezes mais tóxico que o peróxido de hidrogênio, e cerca de 250 vezes mais tóxico que o produto final AB. Assim, é provável que esses efeitos negativos do PB tenham contribuído, de maneira decisiva, para a atividade tóxica do reembasador Durabase Soft sobre as 3 linhagens celulares avaliadas na presente investigação.

O líquido do material Durabase Soft é composto por MMA e o plastificante di-butil ftalato (DBP). Conforme relatado anteriormente, os reembasadores resilientes à base de resina plastificada liberam mais produtos e em maior quantidade que os materiais à base de silicone, entre eles monômeros residuais e plastificantes ftalatos^{22,23,146}. Embora os processos relacionados à toxicidade dos monômeros ainda

não estejam completamente elucidados, alguns mecanismos têm sido relatados na literatura, como danos ao DNA⁴, lesão na dupla camada lipídica das células⁷ e alteração na mobilização dos íons cálcio (Ca^{2+}), os quais atuam como mensageiros secundários e apresentam papel importante em muitos “pathways” de transdução de sinais celulares⁷. Para monômeros hidrofóbicos, como o MMA, foi verificado que o aumento na concentração intracelular de cálcio livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ocorreu de forma dose-dependente. O aumento do ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) também foi relacionado com os valores de $\log P^7$, que é o coeficiente de partição octanol-água, indicativo da hidrofobicidade ou lipofilicidade da substância^{7,9}. Tem sido observado que, dependendo da lipofilicidade ($\log P$) dos monômeros, eles se localizam, predominantemente, nas membranas celulares dos tecidos orais⁵². Outro mecanismo proposto para a citotoxicidade dos materiais poliméricos é o estresse oxidativo causado a partir do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e o sistema de defesa antioxidante (redox)^{5,8}. As EROS geradas pelos materiais resinosos, representadas pelo peróxido de hidrogênio, ânions superóxidos e radicais hidroxilas, são conhecidas por reduzir os níveis intracelulares de moléculas antioxidantes como a glutathione, um removedor direto de EROS^{4,13}. Os ésteres α,β -insaturados, utilizados como monômeros em resinas, entre eles o MMA, podem apresentar toxicidade por meio da reação com nucleófilos intracelulares, como a glutathione reduzida, via adição de Michael⁵². Essa reação envolve a adição de um nucleófilo, denominado doador de Michael, a um eletrófilo (α,β -insaturado), denominado acceptor de Michael. O aumento nas EROS, após a depleção da glutathione, resulta em estresse oxidativo que pode levar a danos no DNA, atraso no ciclo celular e, eventualmente, morte celular, principalmente na forma de apoptose^{4,8,13}. De qualquer forma, podemos supor que a presença do MMA na composição do reembasador resiliente Durabase Soft tenha contribuído, pelo menos em parte, para os efeitos citotóxicos observados no presente estudo. Além disso, o MMA pode se decompor, via hidrólise, em AM¹⁵⁹, o qual também apresenta efeito citotóxico⁸⁵, alterando tanto o metabolismo celular como a síntese de DNA³¹.

Devido a sua estrutura alílica, o AM pode formar moléculas altamente reativas (epóxidos) que podem contribuir para os efeitos citotóxicos⁴⁶.

Além do monômero MMA, o líquido do reembasador resiliente Durabase Soft também contém o plastificante DBP. Os ftalatos e outros ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos têm sido utilizados como agentes “softening” para obter plasticidade dos materiais odontológicos, com aplicação típica nos reembasadores resilientes. No presente estudo, outros materiais avaliados também contêm plastificantes, como o DBP no condicionador de tecidos Softone, o benzil butil ftalato (BBP) no reembasador Trusoft e o benzil benzoato (BB), um plastificante “phtalate ester-free”, presente no condicionador de tecidos Coe Comfort⁶². Resultados similares foram observados em células L929 após exposição ao DBP por 24 hs³¹, e em macrófagos murinos RAW 264.7 expostos por 60 min aos plastificantes BBP e DBP¹¹⁹. A toxicidade dos ésteres de ftalatos tem sido relacionada com o seu metabólito ácido metoxiacético que causa geração de EROS e consequente danos ao DNA e à mitocôndria de fibroblastos humanos. Além disso, foi sugerido que o plastificante BB pode causar danos oxidativos tanto às membranas como às proteínas celulares⁹⁹. O BB é um composto solúvel em gordura (fat-soluble), que pode penetrar nas células através da membrana celular e, então, atuar na mitocôndria, aumentando a permeabilidade, alterando o canal de transporte, inibindo a respiração mitocondrial e produzindo mais espécies reativas. As EROS produzidas podem atacar os ácidos graxos poli-insaturados, induzir peroxidação lipídica e, assim, produzir os peróxidos lipídicos como o malondialdeído, cujo conteúdo reflete a severidade dos radicais livres que atacam, indiretamente, as células do organismo⁹⁹. Assim, é provável que os efeitos citotóxicos observados neste estudo para os materiais Durabase Soft, Softone e Coe Comfort e, em menor extensão, para o material Trusoft, estejam relacionados, pelo menos em parte, à presença dos plastificantes DBP, BB e BBP nas suas composições. Efeitos citotóxicos, como zona de inibição do crescimento, lise celular¹²⁴ e redução da viabilidade celular⁶², quando em contato direto entre condicionadores de tecidos, entre eles o Coe Comfort, foram observados em contato direto com

diferentes células. Por outro lado, Kostic et al.⁷⁹(2012), ao avaliarem os materiais à base de resina plastificada Trusoft, Lang Flexacryl e Lang Immediate em contato com células HeLa por 24 hs, obtiveram média de viabilidade celular de 78,7% no teste de MTT para o material Trusoft. Essa média foi maior que as observadas no presente estudo para o período de contato de 24 hs entre esse material e as células HaCat e RAW 264.7, e menor que a verificada para as células L929. As diferentes linhagens celulares utilizadas podem ter contribuído para essas diferenças entre os resultados, tendo em vista que, no presente estudo foi possível observar que, em geral, os efeitos do contato direto dos materiais avaliados foram mais acentuados sobre as células HaCat e RAW 264.7. Lefebvre et al.⁹³ (2001) observaram que o material reembasador resiliente à base de resina acrílica plastificada (Permasoft) não causou efeito na viabilidade celular avaliada pelo teste MTT quando em contato direto com células Balb/c. Entretanto, estes autores também avaliaram o efeito do material quanto à adesão de *Candida albicans* e, em função disso, as amostras foram imersas em saliva artificial estéril por 5 dias para permitir a liberação de ftalatos, os quais, por apresentarem efeitos citotóxicos, poderiam interferir nos resultados. Isto poderia explicar, mesmo que parcialmente, as diferenças entre os resultados de Lefebvre et al.⁹³(2001) e os dados apresentados no presente estudo. Deve-se ressaltar, ainda, que o tipo de material e célula utilizados nestes estudos, bem como ao tempo decorrido entre o preparo das amostras e a realização dos testes, também podem ter influenciado os diferentes dados apresentados neste estudo.

Para materiais resilientes à base de PEMA, como os utilizados no presente estudo, o álcool é necessário para promover aumento de volume das partículas do polímero (swelling) e facilitar sua dissolução no plastificante, produzindo, assim, um tempo de geleificação clinicamente aceitável (ou adequado)⁶⁵. Desta forma, os materiais Trusoft, Softone e Coe Comfort contêm etanol nas suas composições. Para o primeiro, a concentração de etanol é maior que 50%, sendo que para os demais, esta informação não está disponibilizada. Tem sido relatado que o álcool é liberado a partir dos condicionadores de tecidos^{65,116}, e que a maior liberação

ocorre nas primeiras 12 ou 24 hs⁶⁵. As substâncias liberadas na saliva, a partir desses materiais, tem sido relacionadas com reações adversas nos tecidos orais^{103,118,170}. Entretanto, os resultados do presente estudo demonstraram que, apesar da concentração relativamente alta de etanol, o Trusoft foi, em geral, menos tóxico para as 3 linhagens celulares avaliadas que os materiais Softone e Coe Comfort, nos dois períodos de contato direto estudados (24 e 48 hs). No estudo de Babich e Borenfreund⁹ (1987), os efeitos citotóxicos de vários álcoois foram avaliados, em diferentes linhagens celulares (fibroblastos Balb/c 3T3, macrófagos RAW 264.7, células de Hamster CH V79). Os autores observaram que os efeitos foram relacionados com a lipofilicidade das substâncias testadas, caracterizada pelos valores de log *P*. Para os álcoois com valores de log *P* negativos, isto é mais hidrofílicos e menos lipofílicos, como o etanol (log *P* = - 0,26), as doses para causar redução de 10% na viabilidade celular (NR₉₀) foram maiores (de 428,2 a 513 mM) do que aquelas observadas para álcoois mais lipofílicos, como o 1-octanol (log *P* = 3,15) que variaram de 5,1 a 9,6 mM. Dessa forma, podemos supor que a presença do etanol na composição do Trusoft, Softone e Coe Comfort, independentemente da concentração, não tenha contribuído, de maneira significativa, para as diferenças nos efeitos citotóxicos observadas entre os três materiais. Por outro lado, um fator que pode ter contribuído diretamente para essas diferenças seria o peso molecular dos plastificantes utilizados em cada um dos materiais. O DBP, presente no material Softone, e o BB, presente no Coe Comfort, possuem pesos moleculares de 278,34^{65,119} e 212,25⁶⁵, respectivamente, enquanto o BBP, que faz parte da composição do Trusoft, apresenta maior peso molecular (312,36)¹¹⁹. Tem sido relatado que os plastificantes com maior peso molecular apresentam menor liberação dos materiais resilientes⁶⁵. No estudo de Hong et al.⁶⁵(2010), foi verificado que o material Coe Comfort apresentou liberação do plastificante BB em quantidades significativamente maiores que aquelas liberadas por outros materiais que continham plastificantes BBP e DBP, nos dois períodos de 1 e 14 dias. Assim, podemos supor que os efeitos mais acentuados observados neste estudo, para o contato direto entre as células e o

condicionador de tecidos Coe Comfort, estejam relacionados com o menor peso molecular do BB em relação aos plastificantes DBP e BBP.

4.2 Análise da influência dos materiais reembasadores resilientes na proliferação celular, integrina $\alpha 5\beta 1$ e no fator de crescimento TGF $\beta 1$.

Os materiais colocados na cavidade oral são expostos a uma variedade de substâncias incluindo proteínas, enzimas, diferentes microbiotas e diferentes substâncias vindas da dieta. Esta mistura de fatores causam profundos e permanentes efeitos sobre os materiais que os conduzem à degradação, mudanças mecânicas e químicas, o que pode comprometer a função do material¹⁷, e a liberação de produtos, devido a biodegradação. Com efeito, o impacto dos produtos causados pela biodegradação dos materiais reembasadores nos processos fisiológicos das células e tecidos locais raramente é relatado na literatura. Os estudos, muitas vezes, limitam-se a testar a citotoxicidade destes materiais, ou seja, se as células "vivem ou morrem". Embora estes materiais sejam largamente utilizados na clínica, atenção quanto ao efeito clínico e utilização, tem sido levantada^{43,20}.

Para avaliar a biocompatibilidade dos materiais odontológicos, o tipo celular deve ser cuidadosamente escolhido, afim de mimetizar, o mais próximo possível, a situação clínica. No presente estudo, entretanto, os materiais avaliados entram em contato direto com as células epiteliais e tecido conjuntivo subjacente, na cavidade oral. Sendo assim, e por motivos já mencionados neste texto, foi selecionada as células L929 para avaliar a expressão da integrina $\alpha 5\beta 1$, do fator de crescimento TGF- $\beta 1$ e a proliferação/metabolismo celular (azul de alamar).

De acordo com os resultados deste estudo, os materiais a base de silicone (Ufi Gel P e Sofreliner S) foram os menos citotóxicos, sendo que o Sofreliner S apresentou a melhor resposta metabólica, no teste azul de alamar, em contato com as células L929 após 48 hs, quando comparada ao controle. Esse resultado esta

vinculado a reação de polimerização por adição destes materiais. Além disso, os materiais à base de silicone não possuem plastificantes ou monômeros, como os outros materiais à base de resina acrílica e os condicionadores de tecido, que podem liberar componentes e produtos de degradação. Estes últimos materiais possuem, também, ftalatos e ésteres aromáticos de ácidos carboxílicos, como já mencionado^{118,143,146,170}. Ao contrário dos materiais à base de silicone, os dois materiais à base de resina acrílica (Trusoft e Durabase Soft) induziram menor atividade metabólica (60.7-90.4% e 6.2-8.2%), após 48 hs quando comparado ao controle. Ambos os materiais possuem ftalatos, entretanto, o Trusoft não tem monômero em sua composição o que, provavelmente, justifica o melhor metabolismo celular para o Durabase Soft. Os condicionadores de tecido (Softone e Coe Comfort) apresentaram as menores respostas metabólicas, com 11.2% comparada com o controle, após 48 hs. A liberação de plastificante e álcool etílico, e o provável aumento da biodegradação hidrolítica com a absorção de água nos materiais podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela redução acentuada da viabilidade celular, verificada pelo teste de azul de alamar^{71,166}.

Neste estudo, para a análise da expressão da integrina $\alpha 5\beta 1$, as células foram temporariamente desprovidas do fator de crescimento (soro fetal bovino) no meio de cultura durante 48 hs. Assim, foram observados efeitos adversos dos produtos liberados pelos materiais sobre as células L929, que causaram discreto aumento da expressão da integrina após 48 hs em comparação com 24 hs. Resultados diferentes foram observados para o fator de crescimento TGF- $\beta 1$. Por exemplo, a variação da porcentagem da integrina foi de 8%-13%, para os 6 materiais por 24 à 48 hs em cultura, enquanto que para o TGF- $\beta 1$, a variação da porcentagem entre os dois períodos avaliados variou de 12%-75% para os materiais. Desta forma, observa-se que o TGF $\beta 1$ aumentou a expressão com o tempo, comparada à integrina. Entre as maiores porcentagens de aumento observada após 48 hs, os materiais Durabase Soft,

Sofreliner S, Trusoft e Softone, foram considerados os materiais com maior efeito na expressão da integrina e do TGF- β 1.

Integrinas são receptores heterodiméricos para a adesão molecular na superfície celular e inúmeras proteínas da matriz extracelular. Várias α e β subunidades combinadas exibem ligantes com especificidades diferentes¹³⁶. Por exemplo, a integrina α 5 β 1, possui ligantes específicos para fibronectinas e fibrinas, importantes glicoproteínas da matriz extra celular que possuem papel de adesão, migração, crescimento celular, diferenciação e são muito importantes no processo de reparação de feridas¹²⁹. A integrina α 5 β 1, em resposta a sua ligação com os componentes da matriz extracelular, também tem sido correlacionadas com a angiogênese de tumores. Existem controvérsias, entretanto, se está associada com efeitos supressores de tumor, ou um papel de promotor¹³⁹. As integrinas medeiam uma série de acontecimentos de sinalização nas células, sendo que essas cascatas possibilitam um profundo efeito sobre as atividades celulares normais, bem como “a vida ou a morte”, como a apoptose. Com efeito, células que não aderem efetivamente ao substrato/matriz extra celular sofrem eventos apoptóticos mais facilmente do que as células providas de fatores de crescimento⁵⁰. Integrinas também estão relacionadas no controle de resistências a estímulos apoptóticos e, em particular, na ativação dos sinais das mitocôndrias. Danos causados por produtos químicos, incluindo algumas drogas citotóxicas, ou liberadas por materiais odontológicos, e a retirada do soro fetal bovino, pode levar à liberação do citocromo C pelas mitocôndrias⁵⁹. Integrinas têm mostrado proteger a viabilidade celular em resposta a estresses. A sinalização por integrinas regulam a expressão e a atividade de vários membros das proteínas Bcl-2, que estão associadas com a apoptose¹⁵⁰. Os ligantes da integrina α 5 β 1 leva ao aumento da expressão de Bcl-2¹⁰⁴ e aumenta a resistência a ausência de soro fetal bovino.

O fator de crescimento β (TGF- β) faz parte da família das proteínas e consiste em três citocinas (TGF- β 1, 2, e 3), sendo que a TGF- β 1 é a mais comum e abundante na maioria dos tecidos. O TGF- β se liga a receptores específicos

heterodímero causando a fosforilação intracelular das proteínas Smad. Estes, por sua vez, se ligam com Smad4 para formar complexos heteroméricos, que se translocam para o núcleo e regulam os genes responsivos TGF- β ⁴⁰. As moléculas de TGF- β funcionam como um interruptor celular que regulam uma grande variedade de processos celulares, tais como a função imunitária, proliferação celular, de transição epitelial-mesenquimal e hematopoiese¹⁵³.

Neste estudo, o TGF- β 1 apresentou aumento da regulação das células mantidas durante 48 hs em comparação com aquelas mantidas durante 24 hs em cultura. Sendo que, para os materiais Ufi Gel P, Durabase Soft e Softone houve um aumento significativo na expressão do TGF- β 1 entre os período de 24–48 hs que foi de 30%, 40% e 75%, respectivamente. A maior expressão do TGF- β 1 foi observada após 48 hs para os condicionadores de tecido e esse resultado provavelmente se deve às diferentes composições do Softone e Coe Comfort. O último material mencionado possui em sua composição alguns produtos que não são encontrados no Softone, o que pode ter contribuído para a diminuição da expressão do fator de crescimento. Um aumento no TGF- β 1, e também das integrinas, tem sido associada com a maturação de um proto-miofibroblastos a uma miofibroblastos maduro⁸⁸ que é característica da cicatrização de feridas. Tem sido relatado, também, que o aumento no nível do TGF- β 1 aumentam a proliferação de queratinócitos, que pode ser necessário em áreas da mucosa oral desprovida de epitélio queratinizado. A ausência de soro fetal bovino no meio de cultura descrito neste estudo sugere que as proteínas TGF- β 1 e integrina α 5 β 1, detectadas pelo teste de ELISA, deve ter sido expressa pelas células e que as expressões relativas de cada proteína foram devido aos produtos liberados dos materiais reembasadores. No entanto, é importante notar que este foi um estudo in vitro e realizado em um curto período, retratando apenas a atividade de cultura de células, por um período máximo de 48 hs.

4.3 Análise da influência dos materiais reembasadores resilientes na expressão de proteínas inflamatórias

Como já mencionado, existem relatos na literatura de respostas inflamatórias dos tecidos orais aos materiais reembasadores resilientes^{103,118,170}. Para elucidar os caminhos imunológicos e patológicos envolvidos em reações inflamatórias, é importante quantificar as citocinas envolvidas. Conhecer os perfis das citocinas locais é essencial para se obter conhecimento nos processos imunológicos envolvidos⁵⁴. Dessa forma, no presente estudo, para um melhor entendimento da capacidade pró-inflamatória dos eluatos (24 e 48 hs) dos materiais reembasadores resilientes estudados neste estudo, que são frequentemente empregados em áreas de reparo e cicatrização, foram analisados com relação a alterações nos mediadores inflamatórios liberados por macrófagos.

Nos processos inflamatórios, várias células do sistema imunológico são recrutadas para o local da lesão ou da infecção e podem iniciar a resposta inflamatória⁸⁴. Dentre essas, os macrófagos destacam-se como importantes células de defesa contra a invasão microbiana e substâncias externas e potencialmente prejudiciais, além de sua atuação em funções biológicas como o reparo de ferimentos e a remoção de células remanescentes após lesões ou infecções¹³⁴. Dessa forma, no presente estudo, foram selecionadas as células Raw 264.7, pelos motivos já mencionados nesse texto e devido aos materiais avaliados nesse estudo serem colocados em contato com áreas de tecidos ulcerados ou em fase de cicatrização.

Os resultados obtidos nos testes preliminares com o Kit Mouse Cytokine Array Panel A demonstraram a produção de mediadores inflamatórios pelos macrófagos RAW 264.7 após a exposição das células aos eluatos de 24 e de 48 hs obtidos a partir dos materiais. A quantificação desses mediadores, por meio de testes de ELISA, evidenciou que a produção do fator de necrose tumoral TNF- α foi, em geral, aumentada pelos materiais, principalmente para os eluatos de 48 hs. Os aumentos variaram, aproximadamente, de 33 a 78%. A única exceção, foi o material

Coe Comfort, cujo eluato de 24 hs proporcionou redução do TNF- α em 70%. Fator de necrose tumoral (TNF) é a denominação atribuída a um grupo distinto de citocinas que possuem importantes propriedades antitumorais e reguladoras da imunidade¹¹². Existem dois membros distintos da família TNF: TNF- α e TNF- β . O TNF- α inicialmente denominado como caquetina¹⁸, é uma molécula ubíqua produzida por grande variedade de células em diferentes tecidos, enquanto o TNF- α (também conhecido como linfotóxina-alfa) é produzido por linfócitos ativados³. O TNF- α é um regulador significativo de apoptose e uma importante citocina pró-inflamatória com ações pleiotróficas ou seja, possui múltiplas funções¹⁶¹. O TNF- α possui a capacidade de induzir a produção de diversas substâncias como citocinas (IL-1 β e IL-6, por exemplo), quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas que apresentam a função de ativar a imunidade inata. Altas concentrações de TNF- α em células e tecidos podem induzir apoptose, enquanto baixas concentrações podem promover a proliferação celular e o reparo do tecido após lesões⁴⁵. Além disso, o TNF- α pode estimular, significativamente, a reabsorção óssea local por induzir a osteoclastogênese e influenciar a produção de fatores essenciais para a diferenciação osteoclástica, como o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B e seu receptor (RANK) e a proteína osteoprotegerina²¹. Sabe-se que a regulação do TNF- α é crítica para a homeostase celular e para que o hospedeiro apresente uma resposta imunológica efetiva¹². O TNF- α apresenta-se elevado em certas condições patogênicas e possui o potencial tóxico que resulta em reações de hipersensibilidade com inflamação crônica¹⁴⁷. A IL-1 é uma citocina multifuncional que é responsável por vários processos incluindo a defesa do hospedeiro, inflamação e respostas a injúrias⁸⁰, sendo produzida por muitos tipos celulares, predominantemente macrófagos¹⁴⁷. A liberação da citocina IL-1 β e IL-6 pode ativar macrófagos durante infecção, injúria e inflamação⁸². Assim, aumento na produção de TNF- α , o principal mediador pró-inflamatório liberado pelos macrófagos^{36,56}, e da interleucina IL-1 β , como verificado no presente estudo para alguns dos materiais avaliados, são indicativos de resposta pró-inflamatória pelas células.

As quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular (8-17 Kd) com atividade quimiotática, que participam ativamente nos processos inflamatórios e de reparação tecidual¹¹⁷. A CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1 α) e CCL4 (MIP-1 β) são β quimiocinas produzidas por células, tanto da imunidade inata como adquirida, macrófagos, células dendríticas, células NK, células T $\gamma\delta$ e linfócitos T CD8⁺⁴¹. A família mais diversa e numerosa de quimiocinas é a CC⁹⁸, que pode ser subdividida em quimiocinas constitutivas e induzidas. Tem sido relatado que as quimiocinas CC constitutivas participam dos processos habituais de migração leucocitária; por outro lado, as quimiocinas CC induzidas regulam o recrutamento leucocitário em resposta a sinais imunológicos, inflamatórios e infecciosos. Dentre essas quimiocinas, a proteína quimiotática para monócito – 1 (CCL2/MCP1), por meio de sua ligação com seu receptor CCR2, contribui, significativamente, para processos inflamatórios. Quimiocinas da família CC são capazes, ainda, de induzir a produção de enzimas importantes nos processos de migração celular, em células tumorais e em macrófagos¹²⁵. Kim et al.⁷⁶ (2006), em estudo in vitro, demonstraram que CCL2, CCL5 e CXCL quimiocina ligante 12 (CXCL)12 estão envolvidas na diferenciação dos osteoclastos humanos a partir de precursores de osteoclastos⁷⁶. Pré-osteoclastos expressam os receptores CCR2 e CCR5 e respondem às quimiocinas ligantes, tais como CCL2, CCL3 e CXCL12¹⁴⁵. No presente estudo, em geral a produção das quimiocinas avaliadas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2 e CXCL4) foi reduzida após exposição dos macrófagos RAW 264.7 aos eluatos de 24 e de 48 hs obtidos a partir dos materiais. Para a quimiocina CXCL4, por exemplo, os valores obtidos para os eluatos de 24 e de 48 hs do material Trusoft apresentaram-se abaixo do menor valor da curva padrão. Tem sido relatado que a redução na produção de mediadores inflamatórios pode ser um indicativo de que as células se apresentam com alterações significativas que interferem com as funções celulares normais, como por exemplo, a produção basal dessas substâncias^{12,95}.

Estudos realizados com monômeros utilizados em materiais odontológicos, como o BisGMA, verificaram um aumento dos níveis de TNF- α em

macrófagos RAW 264.7⁸². A exposição de fibroblastos gengivais humanos a eluatos de 72 hs obtidos a partir de um material para restaurações provisórias, quimicamente ativado e à base de PEMA, também resultou em expressão do fator TNF- α significativamente maior que o controle. Da mesma forma, tem sido demonstrado que os monômeros HEMA bem como o sub-produto de degradação de monômeros metacrilatos, o ácido metacrílico (AM) estimularam macrófagos (RAW 264.7) para a liberação de TNF- α ¹⁶⁹. Noda et al.¹²³ (2003), observaram que, embora a exposição de células THP-1 (monócitos) a doses sub-letais de HEMA e TEGDMA, por períodos mais longos (2 semanas) não tenha ativado a secreção de TNF- α , foi observado que esses monômeros podem ter influência na produção dessa citocina quando as células são expostas, posteriormente, a toxinas bacterianas. Assim, os autores concluíram que baixas concentrações de componentes liberados por materiais odontológicos, como monômeros, podem representar um risco à resposta inflamatória normal, mesmo quando nenhuma alteração imediata aparente na função celular for detectada. Moharamzadeh et al.¹⁰⁹ (2008), utilizando um modelo de mucosa oral 3D, também verificaram que a exposição à resina composta contendo o monômero TEGDMA aumentou, significativamente, a quantidade de IL-1 β liberada a partir do tecido. Outros estudos observaram que resinas odontológicas e monômeros como o BisGMA, também podem induzir a produção das citocinas IL-1 β e IL-6 em macrófagos RAW 264.7^{12,82}. Os efeitos foram dependentes do tempo de contato e da concentração do monômero⁸². Já os resultados do estudo de Nishioka et al.¹²¹ (2012), mostraram que a exposição de macrófagos (THP-1) por 3 à 5 hs ao Di-(2-etilhexil) ftalato induziu a liberação de várias citocinas incluindo, TNF- α e IL-1 β , bem como a expressão de diversos genes relacionados a quimiocinas, entre elas as CXCL1, CXCL2 e CCL3. Segundo Nishioka et al.²⁰¹², a produção de citocinas induzida pelo Di-(2-etilhexil) ftalato em macrófagos pode exacerbar as respostas inflamatórias. Além disso, o Di-(2-etilhexil) ftalato também induziu a expressão de genes de várias quimiocinas que atraem neutrófilos, sugerindo que esse plastificante promove reações inflamatórias por induzir os macrófagos a atrair quimicamente (quimiotaxia) os neutrófilos para os

tecidos e pode estar envolvido no desenvolvimento de doenças alérgicas. Kruger et al.⁸⁰ (2012), avaliaram o efeito de alguns plastificantes como di-n-butil ftalato (DBP), benzil butil ftalato (BBP), di-2-etilhexil ftalato (DEHP), diisodecil ftalato (DIDP), di-n-octil (DNOP), e di-isononil ftalato (DINP) na secreção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, e IL-8) por células endoteliais de córnea humana (B4G12). A exposição ao DBP, em concentrações que não afetaram a viabilidade celular, resultou em expressão aumentada do mRNA para IL-1 β e IL-8 comparada com o controle. Embora a secreção das citocinas IL-1 β e IL-6 tenha ocorrido em baixos níveis após a exposição ao DBP, uma tendência para secreção aumentada das duas proteínas foi observada. Todos esses resultados, quando avaliados em conjunto, parecem indicar que os monômeros e plastificantes ftalatos podem ativar citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e tem o potencial de causar distúrbios no processo complexo de regulação de uma resposta celular apropriada do sistema imune. A produção desregulada dessas citocinas pró-inflamatórias pode levar ao aumento da resposta imune, que pode ser parcialmente responsável pela destruição dos tecidos. Assim, podemos supor que as alterações observadas no presente estudo com relação à produção dos mediadores inflamatórios avaliados podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com os monômeros e plastificantes, presentes na composição de alguns dos materiais avaliados, e que podem ser liberados para a cavidade oral, mesmo após a reação de polimerização/geleificação^{22,23,28,58,113,114,146}.

Os resultados de estudos *in vitro*, por serem obtidos em condições diferentes daquelas encontradas *in vivo*, não podem ser relacionados, diretamente, com as condições clínicas. De qualquer forma, este estudo demonstrou que as resinas acrílicas para base de prótese, os materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos apresentam efeitos, em menor ou maior grau, de citotoxicidade quando em contato direto com as células, variando o grau de acordo com sua composição; Este estudo demonstrou, também, pela primeira vez, que para os testes com materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecido houve taxas de necrose maior para os fibroblastos do que para os queratinócitos, que esses

materiais podem desencadear a expressão de determinadas proteínas celulares relacionados com cicatrização de feridas e outros processos celulares na cavidade oral, e estão relacionados com a produção de citocinas e quimiocinas importantes na regulação dos processos inflamatórios e de cicatrização tecidual. Alterações nos níveis desses mediadores inflamatórios podem indicar respostas iniciais dos tecidos diferentes da toxicidade aguda e, dessa forma podem servir como indicadores de efeitos biológicos adversos dos materiais utilizados no reembasamento de bases de próteses removíveis. Além disso, tem sido observado que algumas substâncias quimioatraentes, como a CCL5, também levam a ativação das integrinas¹⁶⁵, moléculas presentes por toda a membrana celular e que apresentam papel importante nos processos de adesão e migração celular, mediando a comunicação entre células e entre células e matriz extracelular.

A rectangular box with a blue border and a drop shadow. The background of the box is a grayscale micrograph showing a dense field of cells, likely a cell culture. The word "Conclusão" is written in a bold, italicized, black serif font in the lower right portion of the box.

Conclusão

5 Conclusão

Dentro das limitações do presente estudo, foi possível concluir que:

1) Os eluatos de 24 hs das resinas acrílicas, não apresentaram efeitos citotóxicos estatisticamente significantes entre eles;

2) Após o contato direto com as células, as resinas acrílicas para base de prótese diminuíram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle. A resina Nature Cryl MC promoveu menor do que para a resina Eclipse, com ou sem barreira de ar. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as resinas Vipi Wave e as outras avaliadas;

3) Não foi verificado efeito citotóxico para os eluatos dos materiais reembasadores resilientes avaliados, os eluatos obtidos com 24 e 48 hs, em nenhuma das células testadas;

4) Os materiais à base de silicone, Ufi Gel P e Sofreliner S, testados no presente estudo, apresentaram menor redução na viabilidade celular, quando em contato direto com as diferentes linhagens celulares testadas, nos períodos de 24 e 48 hs;

5) Os fibroblastos e queratinócitos apresentaram diferentes sensibilidades quando em contato com os eluatos dos materiais reembasadores resilientes testados, de 24 e 48 hs. Sendo que, os fibroblastos apresentaram maiores taxas de necrose celular para ambos os períodos de eluatos;

6) Os quatro materiais reembasadores resilientes e dois condicionadores de tecido testados no presente estudo expressaram a integrina $\alpha 5\beta 1$ e o fator de crescimento (TGF- $\beta 1$), quando em contato direto com os materiais pelos períodos de 24 ou 48 hs.

7) Os materiais reembasadores resilientes e condicionadores de tecidos apresentam efeitos, em menor ou maior grau, na produção de citocinas e quimiocinas importantes na regulação dos processos inflamatórios e de cicatrização tecidual,

quando em contato os macrófacos RAE 264.7 em contato com os eluatos dos materiais obtidos nos períodos de 24 e 48 hs.

A rectangular box with a blue border containing a grayscale microscopic image of a dense field of cells. The cells are irregular in shape and appear to be in various stages of division or movement. The word "Referências" is overlaid on the bottom right of this image in a bold, italicized serif font.

Referências

Referências*

1. Abe Y, Ueshige M, Takeuchi M, Ishii M, Akagawa Y. Cytotoxicity of antimicrobial tissue conditioners containing silver-zeolite. *Int J Prosthodont*. 2003; 16(2): 141-4.
2. Agarwal N, Mehrotra AK. Allergy to self-polymerized acrylic resin in orthodontic patient - A case report. *JIDA*. 2011; 5(4): 506-7.
3. Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem*. 1984; 259(1): 686-91.
4. Aita H, Tsukimura N, Yamada M, Hori N, Kubo K, Sato N, et al. N-acetyl cysteine prevents polymethyl methacrylate bone cement extract-induced cell death and functional suppression of rat primary osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92(1): 285-96.
5. Ali A, Bates JF, Reynolds AJ, Walker DM. The burning mouth sensation related to the wearing of acrylic dentures: an investigation. *Br Dent J*. 1986; 161(12): 444-7.
6. Ata SO, Yavuzylmaz H. In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 91(2): 905-9.
7. Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. (Meth)acrylate monomer-induced cytotoxicity and intracellular Ca(2+) mobilization in human salivary gland carcinoma cells and human gingival fibroblast cells related to monomer hydrophobicity. *Biomaterials*. 2006; 27(34): 5794-800.
8. Att W, Yamada M, Kojima N, Ogawa T. N-Acetyl cysteine prevents suppression of oral fibroblast function on poly(methylmethacrylate) resin. *Acta Biomater*. 2009; 5(1): 391-8.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas. Vancouver.
Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Babich H, Borenfreund E. Structure-activity relationship (SAR) models established in vitro with the neutral red cytotoxicity assay. *Toxicol In Vitro*. 1987; 1(1): 3-9.
10. Babich H, Zuckerbraun HL, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Borenfreund E, Blau L. Benzoyl peroxide cytotoxicity evaluated in vitro with the human keratinocyte cell line, RHEK-1. *Toxicology*. 1996; 106(1-3): 187-96.
11. Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol*. 1995; 17(2): 103-8.
12. Bailey LO, Weir MD, Washburn NR. Quantification of macrophage viability and inflammatory response to dental bonding resins. *J Bioact Compat Polym*. 2006; 21(3): 185-206.
13. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Effects of resinous monomers on the odontogenic differentiation and mineralization potential of highly proliferative and clonogenic cultured apical papilla stem cells. *Dent Mater*. 2012; 28(3): 327-39.
14. Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, Lefebvre CA. Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1993; 6(5): 495-501.
15. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater*. 2006; 22(7): 630-40.
16. Bella J, Berman HM. Integrin-collagen complex: a metal-glutamate handshake. *Structure*. 2000; 8(6): 121-6.
17. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, et al. Biodegradation of acrylic based resins: a review. *Dent Mater*. 2010; 26(5): 171-80.
18. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF—a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*. 1989; 7: 625-55.

19. Bilhan H, Geckili O, Bural C, Sonmez E, Guven E. Prosthetic rehabilitation of a patient after surgical reconstruction of the maxilla: a clinical report. *J Prosthodont.* 2011; 20(1): 74-8.
20. Boeckler AF, Morton D, Poser S, Dette KE. Release of dibenzoyl peroxide from polymethyl methacrylate denture base resins: an in vitro evaluation. *Dent Mater.* 2008; 24(12): 1602-7.
21. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med.* 2005; 54(3): 127-31.
22. Brożek R, Koczorowski R, Rogalewicz R, Voelkel A, Czarnecka B, Nicholson JW. Effect of denture cleansers on chemical and mechanical behavior of selected soft lining materials. *Dent Mater.* 2011; 27(3): 281-90.
23. Brozek R, Rogalewicz R, Koczorowski R, Voelkel A. The influence of denture cleansers on the release of organic compounds from soft lining materials. *J Environ Monit.* 2008; 10(6): 770-4.
24. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(4): 306-12.
25. Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006; 20(5): 879-96.
26. Burke-Gaffney A, Hellewell PG. Eotaxin stimulates eosinophil adhesion to human lung microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 227(1): 35-40.
27. Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M, Giannetti A. Distinctive integrin expression in the newly forming epidermis during wound healing in humans. *J Invest Dermatol.* 1993; 101(4): 600-4.
28. Cazacu M, Racles C, Vlad A, Antohe M, Forna N. Silicone-based composite for relining of removable dental prosthesis. *J Compos Mater.* 2009; 43(19): 2045-55.

29. Çelebi N, Yüzügüllü B, Canay S, Yücel Ü. Effect of polymerization methods on the residual monomer level of acrylic resin denture base polymers. *Polym Adv Technol* 2008; 19(3): 201-6.
30. Cha HS, Yu B, Lee YK. Changes in stress relaxation property and softness of soft denture lining materials after cyclic loading. *Dent Mater.* 2011; 27(3): 291-7.
31. Chaves CA, Machado AL, Carlos IZ, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from dental hard chairside reline resins. *Dent Mater* 2010; 26(10): 1017-23.
32. Chaves CAL, Machado AL, Vergani CE, Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 2012; 107(2): 114-27.
33. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(1): 59-69.
34. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, et al. The effect of heat- and auto- polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand.* 2000; 58(5): 217-28.
35. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology.* 2006; 23(1): 17-22.
36. Daly PM. Macrophages in vitro as a predictive model in polymer toxicology [tese de doutorado] Edinburgh: The University of Edinburgh School of Medicine and Veterinary Medicine; 2008.
37. Danesh G, Hellak T, Reinhardt KJ, Végh A, Schäfer E, Lippold C. Elution characteristics of residual monomers in different light- and auto-curing resins. *Exp Toxicol Pathol.* 2012; 64 (7-8): 867-72.

38. Datar R, Rueggeberg FA, Caughman GB, Wataha JC, Lewis J, Schuster GS. Effects of subtoxic concentrations of benzoyl peroxide on cell lipid metabolism. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 71(4): 685-92.
39. de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, Sacramento PA, et al. Mechanical and biological characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(2): 131-8.
40. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling [Review]. *Nature*. 2003; 425(6958): 577-84.
41. DeVico AL, Gallo RC. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(5): 401-13.
42. Dos Santos MB, Consani RL, Mesquita MF. Influence of different soft liners on stress distribution in peri-implant bone tissue during healing period. A 3-D finite element analysis. *J Oral Implantol*. 2011 Jul 18. [Epub ahead of print]
43. Ebadian B, Razavi M, Soleimanpour S, Mosharraf R. Evaluation of tissue reaction to some denture-base materials: an animal study. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(4): 67-74.
44. Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran)* 2012; 9(4): 180-8.
45. Egan LJ. Tumor necrosis factor- α (TNF- α). *Enc of Gast* p.534-537, 2004.
46. Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of dental composite TEGMA and selected metabolic by-products in human pulmonar cells. *Dent Mater*. 2008; 24(12): 1670-5.
47. Evrard L, Parent D. Oral allergies to dental materials: literature review and report of three cases. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*. 2010; 49(1): 14-8.
48. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater*. 2006; 22(3): 211-22.
49. Fields RD, Lancaster MV. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab*. 1993; 11(4): 48-50.

50. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994; 124(4): 619-26.
51. Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(6): 358-66.
52. Fujisawa S, Kadoma Y. Prediction of the reduced glutathione (GSH) reactivity of dental methacrylate monomers using NMR spectra - Relationship between toxicity and GSH reactivity. *Dent Mater J.* 2009; 28(6): 722-9.
53. Garcia LT, Jones JD. Soft liners. *Dent Clin N Am.* 2004; 48(3): 709–20.
54. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001; 25(4): 386-401.
55. Gonzalez JB. Use of tissue conditioners and resilient liners. *Dent Clin North Am.* 1977; 21(2): 149-59.
56. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol.* 2007; 37: S9-17.
57. Gough JE, Downes S. Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J Biomed Mater Res.* 2001; 57(4): 497-505.
58. Graham BS, Jones DW, Sutow EJ. An in vivo and in vitro study of the loss of plasticizer from soft polymer gel materials. *J Dent Res.* 1991; 70(5): 870-3.
59. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381): 1309-12.
60. Greim H, Ahlers J, Bias R, Broecker B, Hollander H, Gelbke HP, et al. Assessment of structurally related chemicals: toxicity and ecotoxicity of acrylic acid and acrylic acid alkyl esters (acrylates), methacrylic acid and methacrylic acid alkyl esters (methacrylates). *Chemosphere.* 1995; 31(2): 2637-59.
61. Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol.* 2000; 24: 127-52.

62. Hashimoto Y, Nakamura M. Cytocompatibility and viscoelastic properties of phthalate ester-free tissue conditioners. *Dent Mater J.* 2004; 23(3): 412-8.
63. Hashimoto Y, Tanaka J, Suzuki K, Nakamura M. Cytocompatibility of a tissue conditioner containing vinyl ester as a plasticizer. *Dent Mater J.* 2007; 26(6): 785-91.
64. Heino J, Käpylä J. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(12): 1309-17.
65. Hong G, Maeda T, Li Y, Sadamori S, Hamada T, Murata H. Effect of PMMA polymer on the dynamic viscoelasticity and plasticizer leachability of PEMA-based tissue conditioners. *Dent Mater J.* 2010; 29(4): 374-80.
66. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont.* 2001; 14(5): 439-43.
67. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machine. *Cell* 2002; 110(6): 673-87.
68. International Standards Organization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO, 1999.
69. Jepsen KF, Abildtrup A, Larsen ST. Monophthalates promote IL-6 and IL-8 production in the human epithelial cell line A549. *Toxicol In Vitro.* 2004; 18(3): 265-9.
70. John O, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000; 267(17): 5421-6.
71. Jones DW, Sutow EJ, Hall GC, Tobin WM, Graham BS. Dental soft polymers: plasticizer composition and leachability. *Dent Mater.* 1988; 4(1): 1-7.
72. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(3): 340-4.
73. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC, Machado AL, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of storage time in water on the

cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009; 40(10): 93-100.

74. Kanie T, Tomita K, Tokuda M, Arikawa H, Fujii K, Ban S. Mechanical properties and cytotoxicity of experimental soft lining materials based on urethane acrylate oligomers. *Dent Mater J.* 2009; 28(4): 501-6.

75. Katz BZ, Zamir E, Bershadsky A, Kam Z, Yamada KM, Geiger B. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 2000; 11(3): 1047-60.

76. Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NA. MCP-1 induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption. *J Biol Chem.* 2006; 281(2): 1274-85.

77. Kitaura M, Nakajima T, Imai T, Harada S, Combadiere C, Tiffany H, et al. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem.* 1996; 271(13): 7725-30.

78. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater.* 1990; 6(1): 13-6.

79. Kostić M, Najman S, Najdanović J, Krunić N, Kostić I. Application of direct contact test in evaluation of cytotoxicity of acrylic denture base resins. *Acta Medica Medianae.* 2012; 51(1): 66-72.

80. Krüger T, Cao Y, Kjærgaard SK, Knudsen LE, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4G12. *Int J Toxicol.* 2012; 31(4): 364-71.

81. . In vitro ispitivanje potencijalne toksicnosti oralno tkivnih kondicionera. *Hem Ind.* 2011; 65(6): 697-706.

82. Kuan Y-H, Huang F-M, Li Y-C, Chang Y-C. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF κ B activation via PI3K/Akt pathway. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(11): 4003-9.
83. Kumamoto: Chemokine classification. 2001(Acesso em 2013). Disponível em: <http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>. Internet Communication.
84. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res.* 2008; 659(1-2): 15-30.
85. Kurata S, Morishita K, Kawase T, Umemoto K. Cytotoxic effects of acrylic acid, methacrylic acid, their corresponding saturated carboxylic acids, HEMA, and hydroquinone on fibroblasts derived from human pulp. *Dent Mater J.* 2012; 31(2): 219-25.
86. Labban N, Song F, Al-Shibani N, Windsor LJ. Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblast cytokine/growth factor expression. *J Prosthet Dent.* 2008; 100(5): 390-7.
87. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(6): 533-43.
88. Larjava H, Salo T, Haapasalmi, Kramer RH, Heino J. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest.* 1993; 92(3): 1425-35.
89. Larjava H. Oral wound healing: cell biology and clinical management. Oxford: John Wiley; 2012.
90. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(6): 644-50.
91. Lefebvre CA, Schuster GS, Caughman GB, Caughman WF. Effects of denture base resins on oral epithelial cells. *Int J Prosthodont.* 1991; 4(4): 371-6.
92. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1994; 71(2): 178-85.

93. Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent.* 2001; 85(4): 352-6.
94. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007; 25(1): 9-18.
95. Lin NJ, Bailey LAO, Becker ML, Washburn N R, Henderson LA. Macrophage response to methacrylate conversion using a gradient approach. *Acta Biomater.* 2007; 3(2): 163-73.
96. Liu Y, Loftenius A, El Ghazali G, Troye-Blomberg M, Ma S, Ekstrand J. Differential regulation of in vitro cytokine production by human blood cells in response to methylmethacrylate. *J Toxicol Environ Health A.* 1999; 56(3): 165-82.
97. Lobert VH, Brech A, Pedersen NM, Wesche J, Oppelt A, Malerød L, et al. Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Dev Cell.* 2010; 19(1): 148-59.
98. Locati M, Otero K, Schioppa T, Signorelli P, Perrier P, Baviera S, et al. The chemokine system, tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy.* 2002; 57(11): 972-82.
99. Longjuan Q, Fengyun C, Xu Y, Qin L. Study on oxidative damage and genotoxicity of butyl benzyl phthalate on the hepatic cells of rat. *IEEE*, 2010. http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5515275&tag=1
100. Machado AL, Puckett AD, Breeding LC, Wady AF, Vergani CE. Effect of thermocycling on the flexural and impact strength of urethane-based and high-impact denture base resins. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 318-23.
101. Mack, PJ. Denture soft lining materials: clinical indications. *Austr Dent J.* 1989; 34(5): 454-8.
102. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Report.* 2010; 11(2): 97-104.

103. Marín Zuluaga DJ, Gómez OC, Rueda DM. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. *Gerodontology*. 2011; 28(4): 258-63.
104. Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem*. 2001; 276(30): 27757-63.
105. McCabe JF. Soft lining materials: composition and structure. *J Oral Rehabil*. 1976; 3(3):273-8.
106. Melilli D, Currò G, Perna AM, Cassaro A. Cytotoxicity of four types of resins used for removable denture bases: in vitro comparative analysis. *Minerva Stomatol*. 2009; 58(9): 425-34.
107. Moharamzadeh K, Brookand IA, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*. 2009; 2(2): 514-48.
108. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater*. 2007; 23(1): 40-4.
109. Moharamzadeh K, Brook IM, Scutt AM, Thornhill MH, Van Noort R. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. *J Dent*. 2008; 36(5): 331-6.
110. Moreau MF, Chappard D, Lesourd M, Monthéard JP, Baslé MF. Free radicals and side products released during methylmethacrylate polymerization are cytotoxic for osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res*. 1998; 40(1): 124-31.
111. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983; 65(1-2): 55-63.
112. Moustou A-E, Matekovits A, Dessinioti C, Antoniou C, Sfikakis PP, Stratigos AJ. Cutaneous side effects of anti-tumor necrosis factor biologic therapy: a clinical review. *J Am Acad Dermatol*. 2009; 61(3): 486-504.

113. Munksgaard EC. Leaching of plasticizers from temporary denture soft lining materials. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(1): 101-4.
114. Munksgaard EC. Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(2): 166-9.
115. Murata H, Hamada T, Sadamori S. Relationship between viscoelastic properties of soft denture liners and clinical efficacy. *Jpn Dent Sci Rev.* 2008; 44(2): 128-32.
116. Murata H, Narasaki Y, Hamada Taizo, McCabe JF. An alcohol-free tissue conditioner—A laboratory evaluation. *J Dent.* 2006; 34(4): 307–15.
117. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 2000; 95(10): 3032-43.
118. Mutluay MM, Oguz S, Fløystrand F, Saxegaard E, Dogan A, Bek B, et al. A prospective study on the clinical performance of polysiloxane soft liners: one-year results. *Dent Mater J.* 2008; 27(3): 440-7.
119. Naarala J, Korpi A. Cell death and production of reactive oxygen species by murine macrophages after short term exposure to phthalates. *Toxicol Lett.* 2009; 188(2): 157-60.
120. Niarchou A, Ntala P, Pantopoulos A, Polyzois G, Frangou M. Effect of immersion cleansing in color stability and hardness of soft denture reliners. *J Craniofac Surg.* 2012; 23(2): 426-9.
121. Nishioka J, Iwahara C, Kawasaki M, Yoshizaki F, Nakayama H, Takamori K, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces production of inflammatory molecules in human macrophages. *Inflamm Res.* 2012; 6(1): 69-78.
122. Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1998; 213(2): 157-67.
123. Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H. Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF-alpha secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater.* 2003; 19(2): 101-5.

124. Okita N, Hensten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. *J Prosthet Dent.* 1991; 66(5): 656-9.
125. Opdenakker G, Van Damme J. Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. *Immunol Today.* 1992; 13(11): 463-4.
126. Oppenheim JJ. Cytokines: Past, Present, and Future. *Int J Hematol.* 2001; 74(1): 3-8.
127. Ortegon SM, Martin JW, Lewin JS. A hollow delayed surgical obturator for a bilateral subtotal maxillectomy patient: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 2008; 99(1): 14-8.
128. Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90(1): 82-6.
129. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002; 115(20): 3861-3.
130. Park SK, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Changes in properties of short-term-use soft liners after thermocycling. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(7): 717-24.
131. Patil PG. Conventional complete denture for a left segmental mandibulectomy patient: A clinical report. *J Prosthodont Res.* 2010; 54(4): 192-7.
132. Polydorou O, König A, Hellwig E, Kümmerer K. Urethane dimethacrylate: a molecule that may cause confusion in dental research. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91(1): 1-4.
133. Popa C, Netea MG, Van Riel PLCM, Van Der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007; 48(4): 751-62.
134. Porto MP. Ação moduladora do citral e eugenol em eventos genéticos em macrófagos murinos in vitro. [Dissertação de mestrado]. Botucatu: Instituto de Biociências da UNESP; 2012.
135. Ruiz-Genao DP, Moreno de Vega MJ, Sanchez Perez J, Garcia-Diez A. Labial edema due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 2003; 48(5): 273-4.

136. Rupp PA, Little CD. Integrins in vascular development. [Review]. *Circulation Research*. 2001; 89(1):566-72.
137. Sadig W, Almas K. Risk factors and management of dehiscence wounds in implant dentistry. *Implant Dent*. 2004; 13(2): 140-6.
138. Saitoh S, Sasaki K, Nezu T, Taira M. Viscoelastic behavior of commercially available tissue conditioners under compression. *Dent Mat J*, 2010; 29(4): 461-8.
139. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M. Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the fibronectin receptor, as a pertinent therapeutic target in solid tumors. *Cancers*. 2013; 5(1): 27-47.
140. Schmalz G, Schweikl H, Hiller K-A. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *Eur J Oral Sci*. 2000; 108(5): 442-8.
141. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin, cytotoxicity and cell lipid metabolism. *Int J Prosthodont*. 1995; 8(6): 580-6.
142. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*. 2006; 85(10): 870-7.
143. Shanmuganathan N, Padamanabhan TV, Subramaniam R, Madhankumar S. The compliance of temporary soft lining materials - an in vivo & vitro study. *Int J Scient and Res Public*. 2012; 2(6): 1-7.
144. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1997; 10(1): 73-7.
145. Silva TA, Garlet GP, Fukuda SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007; 86(4): 306-19.
146. Sofou A, Tsoupi I, Karayannis M, Owall B. Determination of residual monomers released from soft lining materials with the use of HPLC. *Pak J Anal Environ Chem*. 2007; 8(1): 41-52.

147. Soromou LW, Zhang Z, Li R, Chen N, Guo W, Huo M, et al. Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-O-methyl-naringenin. *Molecules*. 2012; 17(3): 3574-85.
148. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure. *Science*. 1986; 233(1): 532-4.
149. Stansbury JW. Dimethacrylate network formation and polymer property evolution as determined by the selection of monomers and curing conditions. *Dent Mater*. 2012; 28(1): 13-22.
150. Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci*. 2002; 115(19): 3729-38.
151. Suzuki T, Jinno S, Hattori N, Okeya H, Ishikawa A, Deguchi M, et al. The biological properties of a novel ethyl methacrylate resin. *J Int Med Res*. 2006; 34(3): 256-63.
152. Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, et al. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(2): 1561-74.
153. Tandon A, Tovey JC, Sharma A, Gupta R, Mohan RR. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Curr Mol Med*. 2010; 10(6): 565-78.
154. Tay L, Herrera DR, Quishida CCC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology*. 2012; 29(2): 275– 80.
155. Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(6): 607-18.
156. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*. 2002; 18(4): 318-23.

157. Tukay A, Bayindir F, Akyil MS. Cytotoxicity of soft and hard denture lining materials on MA-104, Vero and primary tooth cell culture. *Mat Res Innov* 2010; 14(3): 220-3.
158. Ulfman LH. Mechanisms of eosinophil adhesion to endothelial cells under flow conditions. [Tese Doutorado]. Holanda: Universidade van Utrecht; 2002.
159. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Cass QB. Leachability of degradation products from hard chairside reliner resins in artificial saliva: Effect of water-bath post-polymerization treatment. *J Appl Polym Sci*. 2012; 123(2): 732-9.
160. Vallittu PK, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil*. 1999; 26(8): 666-71.
161. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10: 411-53.
162. Vervaeke S, Dierens M, Besseler J, De Bruyn H. The influence of initial soft tissue thickness on peri-implant bone remodeling. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 [Epub ahead of print]
163. Wang Q-S, Cui Y-L, Dong T-J, Zhang X-F, Lin K-M. Ethanol extract from a Chinese herbal formula, "Zuojin Pill", inhibit the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2012 ; 141(1): 377-85
164. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012; 28(1): 23-40.
165. Weber C, Katayama J, Springer TA. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(20): 10939-44.
166. Wilson J. In vitro loss of alcohol from tissue conditioners. *Int J Prosthodont*. 1992; 5(1): 17-21.

167. Yamada H, Hirai K, Miyamasu M, Iikura M, Misaki Y, Shoji S, et al. Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 231(2): 365-8.
168. Yatabe M, Seki H, Shirasu N, Sone M. Effect of the reducing agent on the oxygen-inhibited layer of the cross-linked reline material. *J Oral Rehabil.* 2001; 28(2): 180-5.
169. Yourtee DM, Tong PY, Eick JD, Zhuang WC, Cobb C, Bean TA, et al. *In situ* hybridization test for TNF- α : A simplified approach to confirming induction of the cytokines by biomaterials. *In Vitro Toxicol.* 1997;10(1): 245-51.
170. Zaki HS, Ketzan KJ, Carrau RL. Hypersensitivity to temporary soft denture liners: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 1995; 73(1):1-3.
171. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(13): 6161-5.
172. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines, a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000; 12(2): 121-7.