

Liliane da Rocha Bonatto

Biocompatibilidade de *primers* e adesivo utilizados na confecção
de próteses maxilofaciais implantorretidas: análise *in vitro*.

Araçatuba - SP

2015

Liliane da Rocha Bonatto



**Biocompatibilidade de *primers* e adesivo utilizados na confecção
de próteses maxilofaciais implantorretidas: análise *in vitro*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Araçatuba – UNESP, para a obtenção do Título de Mestre
em Odontologia – Área de Concentração Prótese Dentária

Orientadora: Profa. Assistente Daniela Micheline dos Santos

Coorientador: Prof. Titular Marcelo Coelho Goiato

Araçatuba - SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA/ UNESP

Bonatto, Liliâne da Rocha.

B699a Biocompatibilidade de *primers* e adesivo utilizados na confecção de próteses maxilofaciais implantorretidas / Liliâne da Rocha

Bonatto. - Araçatuba, 2015

71 f. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Daniela Micheline dos Santos

Coorientador: Prof. Marcelo Coelho Goiato

1. Citotoxicidade imunológica 2. Prótese maxilofacial
3. Resinas acrílicas 4. Elastômeros de silicone 5. Teste de
materiais I. T.

Black D3
CDD 617.69



Dedicat6ria

Dedicatória




Aos meus pais Mauro e Rose,

pelo incentivo e presença constante durante esses dois anos, e pelo apoio e oportunidades que me proporcionaram durante a vida. Vocês são a minha referência, a luz que guia meu caminho.

Por essa razão, gostaria de vos dedicar este Mestrado, e reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e amor.

“*Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só consequência.* (Albert Einstein)



Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais



Em minha opinião, essa é uma das partes mais importantes de uma dissertação, pois não fazemos nada sozinho e a conclusão dessa etapa só pôde ser concluída devido a ajuda de várias pessoas, que não podem ser deixadas de serem citadas aqui. Sou eternamente grata a todos os envolvidos neste projeto, e aos que participaram da minha vida nesses dois anos, vocês foram essenciais. Muito obrigada!

Meu **Pai Celestial**, o quanto pude provar do Seu amor, carinho e zelo. Nos tornamos mais próximos, senti Seu amor incondicional e a presença diária em minha vida. Obrigada meu fiel companheiro, por ter sido meu amparo, por ter me erguido quando estava triste, por ter comemorado comigo nos momentos de alegrias. Só tenho motivos para agradecer o Senhor, por tudo que fazes por mim. “Entregue tua vida e teus problemas, fale com Deus, ele te ajudará a vencer”.

Aos meus pais, **Mauro** e **Rose** pelo amor incondicional. Obrigada pelos princípios ensinados, os quais sempre orientarão a minha vida. Obrigada pela oportunidade de viver em um lar sólido, cheio de amor e união, que contribuiu para o meu crescimento emocional, pessoal e profissional. Todas as vezes que eu voltava de casa para Araçatuba, me sentia revigorada para enfrentar as dificuldades cotidianas. Amo vocês.

Ao meu **amor**, meu companheiro da vida, saiba que seu apoio foi fundamental para que eu concluísse o mestrado. Você é incrível, um ser humano admirável, sempre disposto a ajudar todos a sua volta, obrigada por me proteger, por me amar e cuidar tão bem de mim. Obrigada por me estimular a ser uma pessoa melhor, obrigada por não ter deixado a distância ser um empecilho em nosso relacionamento, e sim ter o tornado mais sólido e estável. Obrigada por ser meu incentivador e por acreditar em mim! Agradeço a Deus pela oportunidade de termos nos reencontrado nessa vida, e pela possibilidade de vivermos novamente esse grande amor. Te amo.

Aos meus **avós**, que mesmo longe, sempre preocupados comigo, perguntando para minha mãe como ela me deixava morar sozinha no interior de São Paulo, que isso era um absurdo. Temos uma ligação muito forte e bonita, amo e amo demais vocês!

Aos meus **irmãos**, por serem meus protetores desde quando nasci. “Esta família é muito unida e também muito ouriçada, brigam por qualquer razão mas acabam pedindo perdão”. Amor de irmão é assim mesmo. Amo vocês.

A minha orientadora **Daniela Micheline dos Santos**, que sorte a minha de ter sido orientada por você, muito obrigada por ter me recebido tão bem, e por confiar em mim. Você é sem dúvida minha mãe científica, pois me ensinou tudo o que sei sobre pesquisa, além de ter me ensinado muitas coisas sobre prótese fixa. Você é uma pessoa admirável, trabalhadora, solícita, nunca diz não, está sempre disposta a ajudar, seja quem for. Obrigada pelo carinho e ensinamentos, você é muito especial.

A minha “segunda” orientadora, digamos assim, **Sandra Helena Penha de Oliveira**, muito obrigada professora, por ter me recebido de portas abertas para fazer pesquisa em seu laboratório, sem ao menos me conhecer. Obrigada pela paciência, pois trabalhar com células, biologia molecular sendo protesista não é nada fácil, é um mundo completamente novo e diferente, e a senhora tornou tudo isso mais simples e possível,

pois no começo, te confesso, achei que não ia dar conta. Obrigada por tudo, gosto muito da senhora.

Ao meu co-orientador **Marcelo Coelho Goiato**, sem o senhor, o grupo de pesquisa em prótese bucomaxilofacial não seria formado, obrigada por permitir que eu faça parte desse grupo, o qual exerce um trabalho humano admirável, sou muito grata a isso. Sempre lembrarei do seu bom humor, contagiando todos à sua volta.

Minha grande amiga **Emily**, difícil expressar todo agradecimento e sentimento que tenho por você. Você foi peça chave para essa etapa ter sido concluída com êxito, a pessoa mais importante e que esteve ao meu lado em todos os momentos desses dois anos, principalmente na execução deste trabalho. Serei eternamente grata a você, obrigada de coração pela amizade, porque além de colegas de trabalho você se tornou uma grande amiga. Com certeza meus dias ficaram mais alegres com sua presença, obrigada pelo companheirismo e lealdade. Amo você, seu futuro será brilhante! Obrigada também ao **Dante** pela amizade construída e consolidada.

A **Marcela Fillié Haddad** a qual idealizou esse projeto junto com a Professora Daniela, obrigada pela oportunidade da realização deste trabalho. Além de competente, você possui a habilidade de nos fazer sorrir, obrigada pelos momentos que passamos juntas.

Ao **Victor Balera**, não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim e pela Emily. Foi você quem nos ensinou como fazer os testes de Elisa e PCR, e de uma maneira alegre e fácil de entender. Mesmo não estando diretamente envolvido neste projeto, você não mediu esforços para nos ajudar, não interessava o dia e a hora, você estava disposto a ajudar, era só não marcar muito cedo que estava tudo certo!! Te admiro pela sua inteligência e bom humor. Obrigada por tudo.

Agradeço também as meninas do departamento de farmacologia, **Flávia, Carluci e Thamine**, sempre educadas e extremamente solícitas comigo, obrigada pela ajuda em todos os momentos, admiro muito vocês.

Aos colegas do departamento de fisiologia, **Murilo, Simone e Jéssica**, vocês são demais, pessoas alto-astrol, tornando os dias mais leve, obrigada.

Aos professores **Aimée, Aldiéris, Antônio, Daniel, Karina, Paulo Zuim e Leonardo** obrigada por todos os ensinamentos, pela amizade e atenção durante todo esse tempo.

Agradeço ao meu amigo **Rodrigo**, você realmente foi meu irmão de Araçatuba, obrigada pelo companheirismo, e ensinamentos na área de prótese bucomaxilofacial. Te admiro muito, menino esforçado e disposto a ajudar a todos. Torço muito pelo seu sucesso.

A minha amiga **Mariana**, obrigada pela amizade e companheirismo durante essa jornada, agradeço a você e sua família por me receber tão bem em suas casas.

As minhas amigas **Adhara, Agda, Carol e Laura** obrigada pelo carinho e pelos momentos que passamos juntas, vocês são especiais.

Aos amigos da pós graduação, **Aljomar, Victor, Aline, Amália**, obrigada pela amizade, ajuda e carinho durante esse percurso.

As professoras **Sandra Helena Penha de Oliveira e Marcela Filié Haddad**, que compõem a minha **banca examinadora**, por terem aceitado o meu convite e por me proporcionarem o privilégio de compartilhar seus conhecimentos comigo. Obrigada pela disponibilização de tempo e pela atenção desprendida na análise deste trabalho.

Agradeço as minha amigas de longa data, minhas irmãs de alma. A distância nunca nos afastou, e sim fortaleceu nossos laços. Obrigada por torcerem pela minha

felicidade e sucesso. Obrigada pela amizade verdadeira e pela presença viva e constante de vocês.



Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai só e nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida, e a prova de que duas almas não se encontram por acaso.

(Antoine de Saint-Exupéry)



Agradecimentos

Agradecimentos



A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, pelo acolhimento e oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À **Coordenadora do Programa de Pós-Graduação da FOA, Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata**, pela luta persistente para a melhora do curso de pós-graduação. Todos nós somos gratos por seu empenho.

A **Capex (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)**, pelo financiamento do meu mestrado.

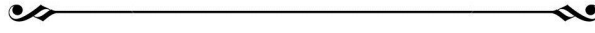
A **FAPESP** pelo auxílio a projeto de pesquisa aprovado, favorecendo a confecção e compra de todo o material utilizado no trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Dentária, **Magda, Dalete, Jander, Ana Marcelina, Eduardinho e Carlão** pela sua dedicação e trabalho e pelos momentos de confraternização e alegrias. Obrigado a todos.




Επίγραφε

Epígrafe



“*Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.*”

(Charles Chaplin)



Resumo

Resumo



Bonatto LR. Biocompatibilidade de *primers* e adesivo utilizados na confecção de próteses maxilofaciais implantorretidas: análise *in vitro*. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

Resumo

A prótese bucomaxilofacial implantorretida pode ser suportada por pele ou por mucosa. Subprodutos dos materiais utilizados na confecção destas próteses podem atuar como irritantes ou causadores de reações alérgicas a tais tecidos. A proposta do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de *primers* e adesivo utilizados na confecção de próteses maxilofaciais retidas por implantes, por meio da análise da proliferação celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de matriz extracelular por queratinócitos humanos. Foram confeccionadas 28 amostras de resina e silicone, em forma de discos (10 x 1 mm), unidas ou não pela aplicação de *primer* e/ou adesivo. Estas amostras foram distribuídas em 7 grupos: Resina (R), Silicone (S), Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone (RAS), Resina + DC 1205 *primer* + Silicone (RDCpS), Resina + Sofreliner *primer* + Silicone (RSpS), Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone (RDCpAS) e Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone (RSpAS). Os

extratos dos materiais testados foram preparados colocando-se quatro amostras de cada grupo experimental em tubos de ensaio contendo 9 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) e incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo ensaio de MTT em cultura de queratinócitos humanos (HaCaT). Foi avaliada, também, a produção das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α e a quimiocina MIP-1 α por meio do ensaio ELISA (Ensaio Imunoabsorbente de Ligação Enzimática). Também foi avaliada a expressão de RNAm para MMP-9, TGF- β e COL-IV por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste Bonferroni, com nível de significância de 5%. Foi possível verificar maiores percentuais de proliferação celular para o grupo RAS, com diferença estatisticamente significativa dos demais grupos estudados. O grupo RDCpS apresentou os maiores valores de concentração de IL6 quando comparado aos demais grupos. Em relação à quantificação relativa de RNAm para colágeno tipo IV, MMP9 e TGF β não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Os materiais testados não apresentaram efeito tóxico sobre a linhagem celular HaCaT.

Palavras-chave: Citotoxicidade imunológica, prótese maxilofacial, resinas acrílicas, elastômeros de silicone, teste de materiais.



Abstract

Abstract




Bonatto LR. Biocompatibility of primers and adhesive utilized for implant-retained maxillofacial prostheses: *in vitro* analysis [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2015.

Abstract

The implant-retained maxillofacial prosthesis can be supported by skin and mucosa. The sub-products produced by the materials used to fabricate these prostheses may act as an irritant factor and cause allergy in these tissues. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of *primers* and adhesive used to bond the acrylic resin and the facial silicone during implant-retained maxillofacial prosthesis fabrication, through the analysis of the cell proliferation, and the production of proinflammatory cytokines and extracellular matrix proteins by keratinocytes. A total of 28 round shape samples (10 x 1 mm) made of resin and silicone bonded or not with *primer* and adhesive was fabricated. Samples were divided into 7 groups: Resin (R), Silicone (S), Resin + Silastic Medical Adhesive Type A + Silicone (RAS), Resin + DC 1205 *primer* + Silicone (RDCpS), Resin + Sofreliner *primer* + Silicone (RSpS), Resin + DC 1205 *primer* + Silastic Medical Adhesive Type A + Silicone (RDCpAS), and Resin + Sofreliner *primer* + Silastic Medical Adhesive Type A + Silicone (RSpAS). Extracts of tested materials were prepared setting four samples of each experimental group in Falcon tube with 9mL of medium (Bulbecco's Modified Eagle's) and incubated at 37°C for 24 hours. After

incubation period, the extract cytotoxicity was evaluated by an assay of cell survival/proliferation (MTT test) in cultures of human keratinocytes (HaCaT). The levels of IL-1, IL-6 and TNF- α and the chemokine MIP-1 α were evaluated by ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). The mRNA expression for MMP-9, TGF- β and collagen type IV were analyzed by the RT-PCR (Real time polymerase chain reaction). Data were submitted to the analysis of variance with Bonferroni post-tests ($p < 0.05$). The results showed increased cell proliferation for the RAS group. The RDCpS group showed the highest IL6 concentration values when compared to other groups. Regarding the relative quantification of mRNA for collagen type IV, MMP9 and TGF β , there was no significant statistical difference between the groups. The materials tested showed no toxic effects on the cell line HaCaT.

Keywords: Acrylic resins, cytotoxicity, materials testing, maxillofacial prosthesis implantation, silicone elastomers.



Listas e Sumários

Lista de Figuras



- Figura 1 -** Percentual de proliferação celular para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão dos percentuais de proliferação celular de cada grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao respectivo grupo não estimulado **40**
- Figura 2 -** Concentração de IL6 para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão da concentração de IL6 (pg/mL). Letras maiúsculas diferentes para cada gráfico indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos **42**

- Figura 3 -** Quantificação relativa de RNAm para colágeno tipo IV para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão da expressão de COL IV. Letras maiúsculas diferentes para cada gráfico indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos..... **43**
- Figura 4 -** Quantificação relativa de RNAm para MMP9 para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão da expressão de MMP9. Letras maiúsculas diferentes para cada gráfico indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos..... **44**
- Figura 5 -** Quantificação relativa de RNAm para TGF β para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical

Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* +
Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram
média \pm erro padrão da expressão de TGF β . Letras maiúsculas
diferentes para cada gráfico indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre
os grupos..... 45

Lista de Tabelas



Tabela 1 - Nome comercial, fabricante e composição química dos materiais utilizados.....	27
Tabela 2 - ANOVA fator único para os valores de proliferação celular	40
Tabela 3 - ANOVA fator único para os valores de IL6.....	42
Tabela 4 - ANOVA fator único para os valores de colágeno tipo IV.....	43
Tabela 5 - ANOVA fator único para os valores de MMP9.....	44
Tabela 6 - ANOVA fator único para os valores de TGF β	45

Lista de Abreviaturas e Siglas




1. IL1 β - interleucina 1 β
2. IL6 - interleucina 6
3. TNF α - fator de necrose tumoral α
4. CCL3/MIP1 α - proteína inflamatória de macrófagos 1 α
5. ELISA - Ensaio Imunoabsorbente de Ligação Enzimática
6. RT-PCR - reação de polimerase em cadeia em tempo real
7. COL IV - colágeno tipo IV
8. MMP9 - metaloproteinase de matriz 9
9. TGF β - fator de transformação do crescimento β
10. MTT - 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
11. RNAm - RNA mensageiro
12. C_T - Threshold Cycle
13. ANOVA - Análise de variância
14. % - percentual
15. pg/mL - picograma por mililitro
16. GNE - grupo não estimulado
17. R - resina
18. S - silicone
19. RAS - resina + adesivo + silicone

- 20.** RDCpS - resina + DC 1205 *primer* + silicone
- 21.** RSpS - resina + sofrerliner *primer* + silicone
- 22.** RDCpAS - resina + DC 1205 *primer* + adesivo + silicone
- 23.** RSpAS - resina + sofrerliner *primer* + adesivo + silicone

Sumário



1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3 RESULTADOS	40
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	58



Introdução

1 Introdução

A prótese bucomaxilofacial é uma especialidade envolvida na reabilitação de pacientes mutilados e consiste na tentativa de reparar grandes perdas ósseas e teciduais por eles sofridas [1,2]. Considerando essa realidade, o objetivo das próteses faciais é oferecer condições estéticas e conforto a esses indivíduos, tendo impacto direto sobre sua autoestima e qualidade de vida [1,3-5].

Com o avanço da implantologia nos últimos anos, ocorreu uma renovação no ramo das próteses bucomaxilofaciais. Atualmente é possível não somente obter excelentes trabalhos protéticos, mas também estabilizá-los e retê-los de forma adequada por meio de implantes osseointegrados [4,6-9]. Contudo, clinicamente observa-se que os silicões, comumente utilizados na confecção destas próteses, apresentam reduzida união aos sistemas de retenção dos implantes (sistemas esférico, barra-clip e magneto), podendo estes se soltarem facilmente do silicone, permanecendo ainda, conectados ao implante [7,10-12].

Na tentativa de minimizar esta limitação, a literatura científica tem difundido alguns trabalhos clínicos que associam a resina acrílica ao silicone facial [7,8,11]. Nesta técnica, o dispositivo de retenção dos implantes se encontra embutido na resina acrílica que, por sua vez, é recoberta por silicone. Porém, clinicamente, a união resina/silicone não é segura, pois são materiais com composições diferentes não havendo união química entre eles, podendo o silicone rasgar ou se separar da resina durante a tentativa de remoção da prótese pelo paciente [7]. Para melhorar a adesão entre resina e silicone, alguns trabalhos apresentam a associação destes materiais à *primers* e adesivos, próprios para uso em prótese maxilofacial [9] ou com a finalidade de realizar a união do reembasador (à base de silicone) com a resina acrílica, no caso de próteses removíveis [13].

Contudo, subprodutos dos materiais acima mencionados, em contato com a mucosa ou pele, podem atuar como irritantes, desencadeando processo inflamatório, podendo ser até mesmo carcinogênicos [14,15]. Por a importância do material ser biocompatível, o qual não irá provocar efeitos indesejáveis, sendo uma característica fundamental para o sucesso da reabilitação [14,16]. A literatura disponibiliza vários métodos para avaliar a biocompatibilidade dos materiais odontológicos [14,15]. Os principais são: teste de citotoxicidade *in vitro* com cultura de células [15,17,18]. Os quais são de execução relativamente simples, de custo razoável quando se considera sua efetividade, e podem ser cuidadosamente controlados [17,19].

Para a realização do teste *in vitro* com cultura de células, pode-se utilizar culturas primárias ou linhagem celular. A linhagem de queratinócitos humanos HaCaT tem sido amplamente usada em análises de potenciais efeitos de drogas sobre a pele [20]. Esta linhagem celular foi estabelecida em 1988 como cultura de células epiteliais humanas provenientes de pele de indivíduos adultos, espontaneamente transformada em imortais, que mantiveram a morfologia do queratinócito e a capacidade de diferenciação epidermal normais [20].

Uma variedade de insultos ambientais como agentes carcinogênicos, substâncias químicas e raios UV, pode induzir os queratinócitos à liberação de mediadores presentes no processo inflamatório, tais como interleucina 6, fator de necrose tumoral α e interleucina 1 β . Esses mediadores são as principais citocinas pró-inflamatórias e possuem a capacidade de aumentar a concentração local de células para reparação tecidual [21]. Outro aspecto de extrema importância que se relaciona diretamente com o processo inflamatório é o reparo tecidual, fenômeno complexo que restabelece a integridade morfológica e funcional do tecido lesado [22]. Esse reparo acontece quando há um equilíbrio na produção de colágeno, metaloproteinase de matriz e transformação

de crescimento β (TGF β). O colágeno do tipo IV é uma proteína de constituição da matriz extracelular, já a metaloproteinase de matriz (MMP9) apresenta a capacidade peculiar de degradar colágeno tipo IV, enquanto o TGF β estimula a síntese do colágeno [23-25].

O uso de grande variedade de materiais na confecção de próteses faciais torna o teste de biocompatibilidade necessário [14,15]. Contudo, a literatura odontológica contém poucos relatos de teste de biocompatibilidade de materiais para próteses maxilofaciais [14,15]. Pela literatura pode-se verificar estudos que avaliem a citotoxicidade de silicões faciais [14,15], resinas acrílicas [16-18,26-28] e materiais resilientes [18,29], mas não são encontradas avaliações dos *primers* e adesivos utilizados para adesão de resina acrílica e silicone. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de *primers* e adesivo utilizados na união de resina acrílica e silicone facial, indicados para a confecção de próteses maxilofaciais retidas por implantes. Esta avaliação ocorreu por meio da análise *in vitro* da proliferação celular pelo ensaio de MTT, da análise da produção de citocinas pró-inflamatórias e produção de proteínas de matriz extracelular por queratinócitos humanos.

A hipótese nula testada foi que a aplicação de *primers* e adesivo não produziram efeitos tóxicos sobre a linhagem celular estudada (HaCaT).

2 Materiais e Métodos

Confeção dos corpos de prova

Foram confeccionadas 28 amostras constituídas por discos de resina acrílica e/ou silicone facial, distribuídas nos seguintes grupos (n=4): Resina (R), Silicone (S), Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone (RAS), Resina + DC 1205 *primer* + Silicone (RDCpS), Resina + Sofreliner *primer* + Silicone (RSpS), Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone (RDCpAS) e Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone (RSpAS). (Tabela 1)

Tabela 1. Nome comercial, fabricante e composição química dos materiais utilizados.

NOME COMERCIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO QUÍMICA
ORTO CLAS	Artigos Odontológicos Clássico Ltda, São Paulo, Brasil	Líquido: Monômero de metil metacrilato, acetona, ácido cianídrico e álcool metílico Pó: Polímero de metil metacrilato
SILASTIC MDX 4-4210	Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA	Polímero de dimetilsiloxano com carga de sílica e catalisador de platina
SILASTIC MEDICAL ADHESIVE TYPE A	Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA	Metiltriacetoxissilano
DC 1205 PRIMER	Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA	Propilenoglicol, tolueno, butanona, éter e bisfenol A
SOFRELINER PRIMER	Tokuyama Corp., Taitou-ku, Tóquio, Japão	Cloreto de metileno, polimetilmetacrilato com organo poli siloxano

Para a confecção dos discos em resina acrílica foi utilizada uma matriz metálica constituída por duas partes, superior e inferior. A parte superior da matriz era totalmente lisa e a inferior composta por 35 compartimentos circulares com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura [16]. Os discos em resina foram confeccionados com resina acrílica quimicamente ativada [7,8].

Essa foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante, e inserida nos compartimentos da matriz. Após a inserção da resina a parte superior da matriz foi posicionada sobre a parte inferior sendo o conjunto levado a uma prensa hidráulica de bancada (Midas Dental Produtos Ltda, Araraquara, SP, Brasil) com carga de 1,25 toneladas, permanecendo em repouso durante 10 minutos. Após esse período, a matriz foi colocada sob pressão hidrostática de 20 libras em uma polimerizadora (Metalvander, Piracicaba, SP, Brasil) durante 20 minutos. Após este período os discos foram desincluídos e submetidos ao acabamento com brocas abrasivas maxi-cut (Vicking, SP, Brasil), para remoção dos excessos. [30]

Os discos de silicone MDX4-4210 foram confeccionados em uma matriz metálica composta por 35 compartimentos circulares com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Para os demais grupos, os discos de silicone foram confeccionados em uma matriz metálica sobre os discos de resina acrílica. Desse modo, uma matriz metálica foi utilizada, similar a parte inferior da matriz que foi utilizada na confecção dos discos de silicone, tendo como diferencial apenas a espessura, de 2 mm. Os discos de resina acrílica, com 1 mm de espessura, foram limpos com acetona e gaze e então, posicionados no interior desta matriz.

Sobre a superfície dos discos de resina acrílica dos grupos RDCpS, RSpS, RDCpAS e RSpAS foi aplicada uma fina camada de *DC1205 primer* [30,31] ou *Sofreliner primer* [13] com intuito de expor a superfície da resina, tornando-a mais

susceptível à penetração do adesivo. Após a aplicação dos *primers*, foram aguardados 30 minutos [30].

O silicone facial MDX 4-4210 foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante, em temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $50 \pm 10\%$. Antes da introdução do silicone no molde, uma fina camada de adesivo Silastic Medical Adhesive Type A [11,31] foi aplicada diretamente sobre a superfície preparada de resina acrílica dos grupos RAS, RDCpAS e RSpAS. Após esse processo o silicone já manipulado foi inserido nos compartimentos da matriz sobre a resina, e então foi passada uma espátula metálica sobre a superfície para a regularização da espessura e da superfície do silicone. A matriz foi levada à polimerizadora com pressão de 20 libras durante 20 minutos. Após este período, o silicone, contido na matriz, foi mantido com a superfície exposta ao meio ambiente por 72 horas conforme recomendação do fabricante [30].

Obtenção dos extratos

Os extratos das substâncias hidrossolúveis presentes nos corpos de prova foram utilizados para a análise do efeito citotóxico das mesmas [18,19,32-34]. Quatro corpos de prova de cada grupo foram colocados em um tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos) suplementado com 10% de soro fetal bovino [27], e incubados em estufa à 37°C durante 24 horas.

Durante esse período de incubação, as substâncias foram difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos que foram utilizados no teste de citotoxicidade. Depois de solubilizados, os extratos foram filtrados com filtros Millex (Millipore, Darmstadt, Alemanha) de $0,22 \mu\text{m}$ para esterilização, tendo em vista a grande facilidade de contaminação do meio devido a sua riqueza em nutrientes [14,16].

Cultura de células e Teste de citotoxicidade

O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos materiais testados foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, queratinócitos (HaCaT) foram expandidos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos), 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos), 10 µg/mL de penicilina (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos), 10 µg/mL de gentamicina (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos), e 250 µg/mL de fungizone (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos), [17]. O cultivo das células foi realizado em garrafas para culturas de células com tampa, contendo um filtro que permite a passagem de CO₂ (TPP, Trasadingen, Suíça). Essas garrafas foram incubadas com 5% de CO₂, à temperatura de 37° C, em ambiente com umidade controlada [35].

Para a realização dos testes de citotoxicidade suspensões celulares de 1×10^5 células/mL, previamente determinadas por um estudo piloto foram preparadas. Para isso, 1 mL desta suspensão foi pipetado em cada poço, de uma placa de 24 poços. Após 24 horas de incubação com 5% de CO₂, em ambiente com umidade controlada à temperatura de 37°C (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos), o meio de cultura foi aspirado e 500 µL de extratos dos diferentes grupos foram adicionados em cada um dos poços. O grupo não estimulado consistia em poços sem tratamento e receberam apenas o meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. Já nos poços controle positivo, foi adicionado Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). As mesmas condições de incubação e temperatura determinadas para a obtenção dos extratos foi utilizada para essa placa.

Após 72 horas dos extratos em contato com as células, o meio de cultura com os extratos foram removidos e substituídos por 0,5 mL de meio DMEM sem a adição de soro fetal bovino contendo 0,5 mg/ml de MTT (3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-

tetrazolio) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), e incubados por 4 horas com 5% de CO₂ à temperatura de 37 °C [14,16].

Em seguida, os meios de cultura foram descartados e o formazan intracelular foi liberado pela solubilização com 1mL de álcool etílico 100% (AraçaProlab, Araçatuba, São Paulo, Brasil). As placas foram agitadas por 5 minutos e, então, a mensuração das absorvâncias das amostras foi realizada a 570nm em espectrofotômetro UV-Visível (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos). O ensaio de MTT foi realizado em triplicata [14,17,18,26,27].

Determinação dos níveis de IL1 β , IL6, TNF α e CCL3/MIP1 α no sobrenadante das culturas das células de linhagem estimuladas pelo extrato.

O sobrenadante das culturas foi coletado após 72 horas de imersão dos extratos em contato com as células. A coleta teve o objetivo de dosar as citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 β (IL1 β), interleucina 6 (IL6) e fator de necrose tumoral α (TNF α) e, a proteína inflamatória de macrófagos 1 α (CCL3/MIP1 α) pelo Ensaio Imunoabsorvente de Ligação Enzimática (ELISA) (DuoSet ELISA Development Systems, R&D System, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) [35,36]. Um total de 100 μ L do sobrenadante foi utilizado para a análise quantitativa das amostras. A análise foi realizada em triplicata e seguiram-se as recomendações do fabricante [35,36].

Reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) em tempo real

A quantificação da expressão dos genes para colágeno tipo IV (COL IV) (COL4A3BP: Hs00178621_m1), metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) (MMMP9: Hs00234579_m1) e fator de transformação do crescimento β (TGF β) (TGFB1: Hs0099133_m1) [37] foi realizada por meio da análise da reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) em tempo real.

Para a extração de RNA total das células após o período de imersão do extrato em contato com as células por 72 horas, o reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) foi utilizado conforme as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi mensurada por espectrofotometria. Com a utilização de 1 µg de RNA total e Superscript II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), as primeiras cadeias de cDNA foram sintetizadas. Posteriormente, os níveis de RNAm para colágeno tipo IV, MMP9 e TGF β foram amplificados e mensurados por meio de um aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). O controle endógeno utilizado para detecção de RNAm foi a β-actina (ACTB: Hs03023880_g1). Para a execução das reações, foi utilizado um volume total de 20 µL. A análise foi realizada em duplicata para cada amostra. Para a análise dos resultados, foi utilizado o método de C_T (Threshold Cycle) comparativo. [35].

Análise dos Resultados

Os dados obtidos nos ensaios de MTT, ELISA e RT-PCR em tempo real foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de fator único, seguido pelo teste de Bonferroni, com nível de significância de 5%.

3 Resultados

Pode-se observar, durante a análise da proliferação celular, diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p=0,000$; Tabela 2). Foram verificados maiores percentuais de proliferação celular para o grupo RAS (137,03%), com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estimulado (104,77%) (Figura 1).

Tabela 2. ANOVA fator único para os valores de proliferação celular.

Origem	Soma dos Quadrados	Df	Quadrado Médio	Z	P
Material	54926,258	8	6865,782	281,905	0,000
Erro	803,714	33	24,355		
Total	419398,221	42			
Total corrigido	55729,972	41			

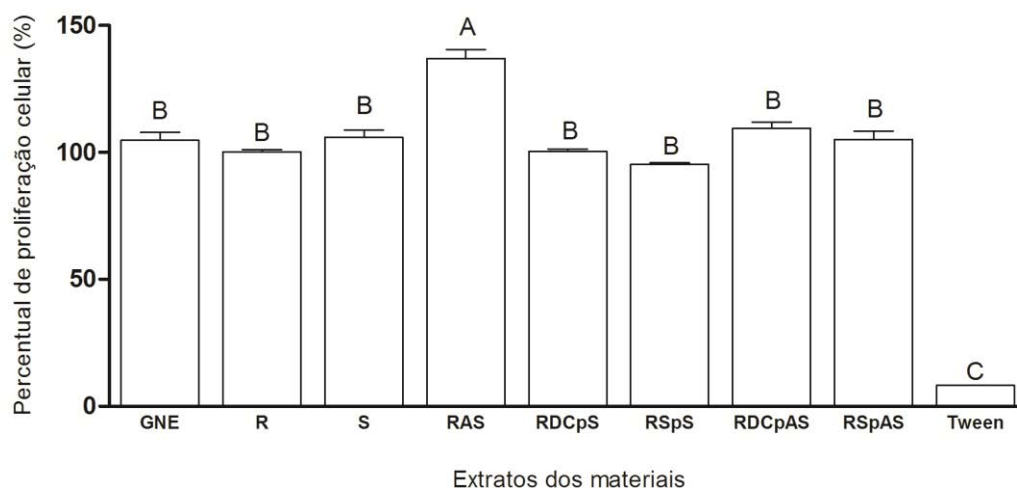


Figura 1. Percentual de proliferação celular para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS:

Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão dos percentuais de proliferação celular de cada grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao respectivo grupo não estimulado.

Com relação à concentração de IL1 β , TNF α e CCL3/MIP1 α , no presente trabalho não foram encontrados níveis detectáveis desses alvos. Contudo, concentrações de IL6 foram verificadas nos diferentes grupos, apresentando o grupo RDCpS maior concentração de IL6 (1.005,84 pg/mL), estatisticamente significativa, quando comparado aos demais grupos (Tabela 3 e Figura 2).

Tabela 3. ANOVA fator único para os valores de IL6.

Origem	Soma dos Quadrados	Df	Quadrado Médio	Z	P
Material	563340,531	7	80477,219	37,130	0,000
Erro	26009,090	12	2167,424		
Total	6146118,995	20			
Total corrigido	589349,621	19			

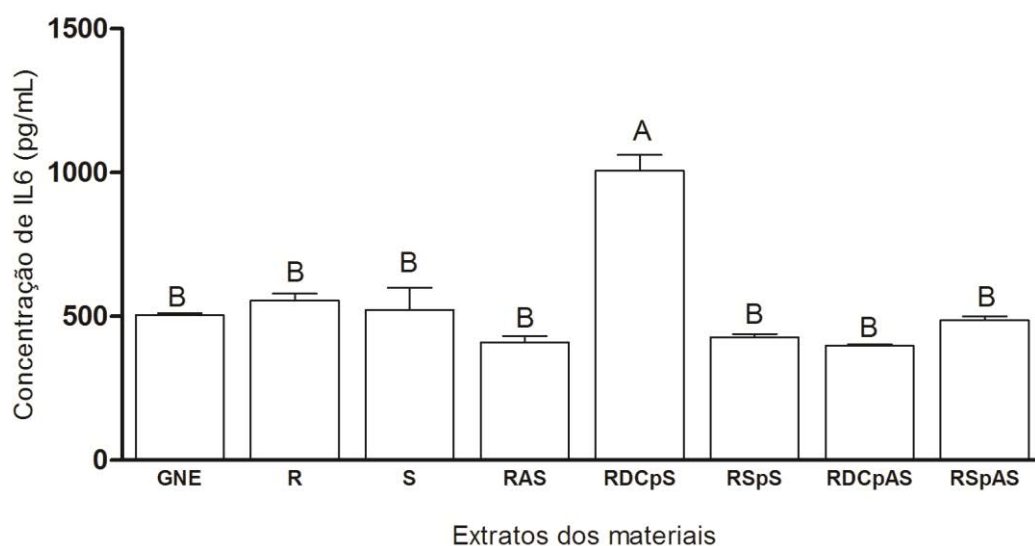


Figura 2. Concentração de IL6 para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão da concentração de IL6 (pg/mL). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos.

Em relação à quantificação relativa de RNAm para colágeno tipo IV, MMP9 e TGF β não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p=0,577$; $p=0,340$ e $p=0,109$, respectivamente Tabelas 4, 5 e 6; Figuras 4, 5 e 6).

Tabela 4. ANOVA fator único para os valores de colágeno tipo IV.

Origem	Soma dos Quadrados	Df	Quadrado Médio	Z	P
Material	19,453	7	2,779	,824	0,577
Erro	80,922	24	3,372		
Total	600,366	32			
Total corrigido	100,375	31			

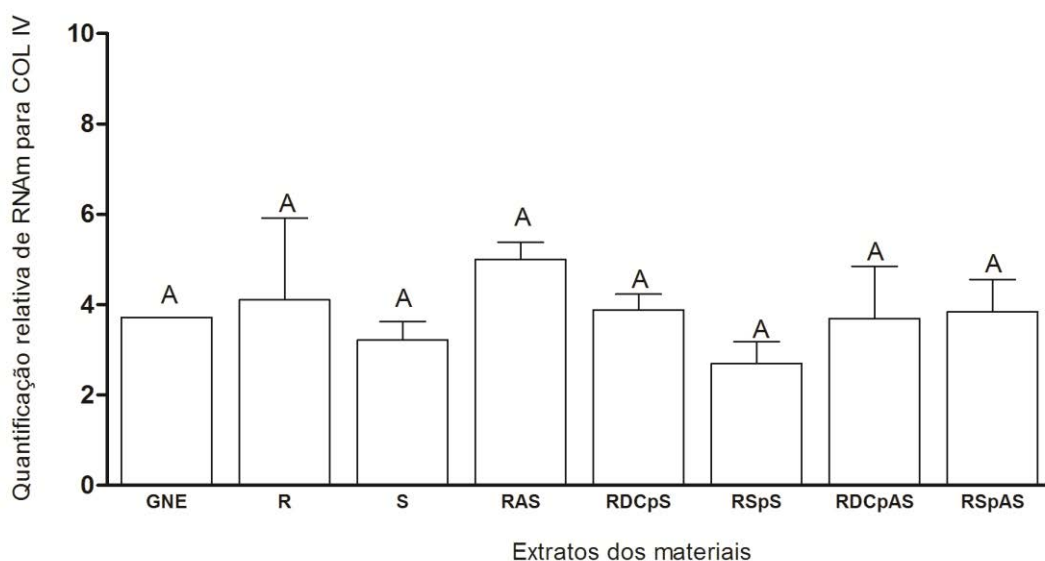


Figura 3. Quantificação relativa de RNAm para colágeno tipo IV para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone.

primer + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão da expressão de colágeno tipo IV. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos.

Tabela 5. ANOVA fator único para os valores de MMP9.

Origem	Soma dos Quadrados	Df	Quadrado Médio	Z	P
Material	,464	7	,066	2,679	0,340
Erro	,594	24	,025		
Total	2,503	32			
Total corrigido	1,058	31			

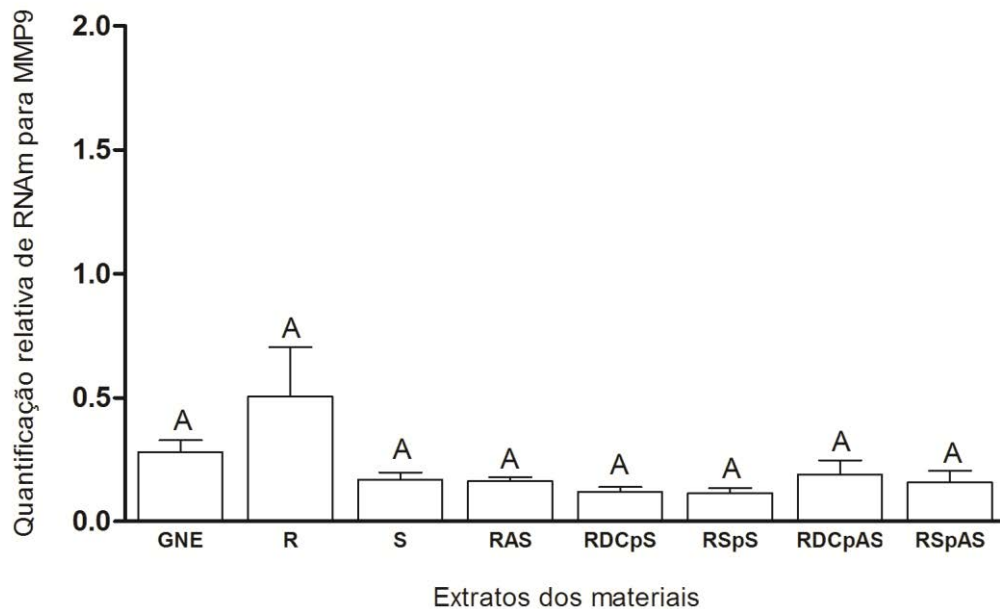


Figura 4. Quantificação relativa de RNAm para MMP9 para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone.

RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão da expressão de MMP9. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos.

Tabela 6. ANOVA fator único para os valores de TGF β .

Origem	Soma dos Quadrados	Df	Quadrado Médio	Z	P
Material	74,546	7	10,649	1,940	0,109
Erro	126,239	23	5,489		
Total	1215,628	31			
Total corrigido	200,785	30			

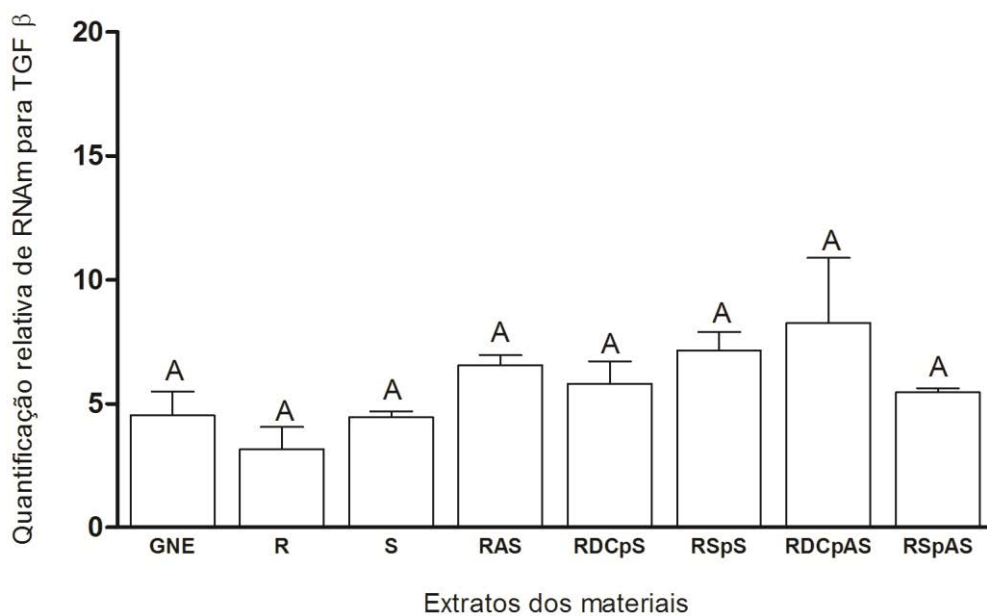


Figura 5. Quantificação relativa de RNAm para TGF β para os diferentes extratos avaliados. GNE: grupo não estimulado. R: Resina. S: Silicone. RAS: Resina + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RDCpS: Resina + DC 1205 *primer* + Silicone. RSpS: Resina + Sofreliner *primer* + Silicone. RDCpAS: Resina + DC 1205 *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. RSpAS: Resina + Sofreliner *primer* + Silastic Medhical Adhesive Type A + Silicone. Os resultados mostram média \pm erro padrão da expressão de TGF β . Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos.

4 Discussão

A hipótese nula testada de que a aplicação de *primers* e adesivo não produziria efeitos tóxicos sobre a linhagem celular estudada (HaCaT) foi aceita.

Antes da execução do presente trabalho, foi realizado um estudo piloto, com o objetivo de determinar a suspensão celular, a qual foi estabelecida em (1×10^5) células/mL). As amostras foram incubadas durante 24 horas para a formação do extrato, pois acredita-se que nas primeiras 24 horas ocorra maior liberação de subprodutos presentes nos materiais [16,38]. Para que houvesse uma camada de células confluentes, o período de 72 horas de contato dos extratos com as culturas de células foi selecionado para o teste de citotoxicidade.

De acordo com a ISO-standard 10993-5, os métodos *in vitro* para a análise da citotoxicidade podem ser classificados como não citotóxicos (proliferação celular maior que 75%), discreta citotoxicidade (proliferação entre 50 e 75%), moderada citotoxicidade (entre 25 e 50%) e alta citotoxicidade (menor que 25%) [33]. Como todos os grupos do presente estudo apresentaram proliferação celular maior que 75%, pressupõem-se que os materiais testados não foram citotóxicos às células HaCaT (Figura 1).

Pode-se observar ainda maiores percentuais de viabilidade celular para o grupo RAS (137,03%) sendo esse diferente estatisticamente do grupo GNE. Acreditamos que o grupo RAS estimula o metabolismo celular, sem alterar os níveis de quimiocinas e citocinas, como pode ser observado pela figura 2. Porém, são necessários estudos *in vivo* para analisar se o grupo RAS estimula esse metabolismo a ponto de fazer queleide ou se ele realmente não altera os níveis de citocinas. A citotoxicidade dos materiais de resina acrílica (grupo R) e silicone (grupo S) já foi avaliada por diferentes autores, nos quais muitos comprovaram a biocompatibilidade desses materiais sobre uma linhagem

celular específica [14,15,27,39,40], o que vem contribuir demasiadamente com os resultados do presente estudo. No entanto, não há estudos que avaliem a biocompatibilidade de *primers* e adesivos, por isso a necessidade e importância da realização deste trabalho.

Apesar de nenhum dos materiais testados terem sido tóxicos, pode-se observar maior liberação, estatisticamente significativa, de IL6 no grupo RDCpS. Sabe-se que a IL6 é um mediador inflamatório, responsável pelo aumento da concentração local de células para reparação tecidual [37,41], sugerindo que o *primer* DC 1205 associado à Resina e ao Silicone pode ter iniciado o processo inflamatório. No entanto, verifica-se que quando existe associação do *primer* ao adesivo Silastic Medhical Adhesive Type A, no grupo RDCpAS, o nível de IL6 diminui, apresentando semelhança estatística ao grupo não estimulado, o que sugere sempre a associação dos dois para uso clínico (Figura 2). Segundo Gabay et al. [41] a IL6 tem efeito duplo, na inflamação crônica é bastante pró-inflamatória, mas em alguns níveis ela atua como um mecanismo de defesa (anti-inflamatória), estimulando a produção de IL-1 (mediador anti-inflamatório), no entanto não foi o que aconteceu em nosso estudo, pois não foram encontradas concentrações detectáveis de IL-1 β .

Assim como não foram encontradas concentrações detectáveis de IL-1 β , também não foi detectado concentrações de TNF α e CCL3/MIP1 α , sugerindo que o estímulo dado pelos extratos dos materiais testados não foi suficiente para a célula HaCaT secretar tais mediadores inflamatórios.

Com relação à quantificação relativa de RNAm para COL IV, MMP9 e TGF β , não ocorreu diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estimulado, indicando que a linhagem de células HaCaT parece produzir esses alvos em condição fisiológica. Foi observada semelhança no aumento da expressão gênica de

COL IV, assim como da expressão gênica de TGF β (proteína responsável pelo estímulo do processo de síntese de COL IV) [25]. Sabe-se que o equilíbrio entre a síntese e a quebra de colágeno é essencial durante o processo de reparo tecidual, para evitar uma reação fibrosa [42], e que o COL IV, produzido por células epiteliais, é essencial na composição da sua membrana basal [43]. É fundamental que ocorra equilíbrio na expressão de RNAm para COL IV, MMP9 e TGF β , para a preservação da estrutura celular.

A escolha dos materiais utilizados neste estudo foi fundamentada em um artigo que avaliou a resistência de união da resina acrílica e do silicone associado ao *primer* DC 1205, *sofreliner primer* e/ou Silastic Medhical Adhesive [30]. Os autores observaram que o Sofreliner foi o que obteve os melhores resultados, além de não ser considerado tóxico. Já o Adesivo Silastic Medhical que é o mais indicado para promover a união do silicone MDX, não melhorou e nem piorou a resistência de união e também não foi tóxico, no entanto como um dos maiores problemas da prótese bucomaxilofacial é a união da resina ao silicone, nós sugerimos a união desses materiais por meio da aplicação do Sofreliner *primer*. Porém esse *primer* possui um custo elevado além de não ser vendido separadamente do material reembasador, então, também pode-se utilizar o *primer* DC1205 associado ao adesivo, o qual juntos apresentaram boa resistência de união [30] e não apresentaram efeito tóxico.

Foram realizados no presente estudo, *testes in vitro* de análise da citotoxicidade e ativação celular. Embora seja uma etapa necessária para avaliar a biocompatibilidade de materiais odontológicos [18], eles apresentam algumas limitações, visto que os resultados não correspondem completamente às propriedades citotóxicas dos materiais na sua condição clínica [44,45]. Estudos futuros podem ser realizados para analisar diferentes mediadores inflamatórios, e avaliar separadamente os *primers* e adesivo

utilizados no trabalho, e também estudos *in vivo*, os quais possuem resultados mais próximos com a realidade clínica.

5 Conclusão

Os materiais testados não apresentaram efeito tóxico sobre a linhagem celular HaCaT.

Referências

1. Chung RWC, Siu ASC, Chu FCS, Chow TW. Magnet-retained auricular prosthesis with an implant-supported composite bar: a clinical report. *J Prosthet Dent* 2003; 89(5):446-9.
2. Leonardi A, Buonaccorsi S, Pellacchia V, Moricca LM, Indrizzi E, Fini G. Maxillofacial prosthetic rehabilitation using extraoral implants. *J Craniofac Surg* 2008; 19(2):398-405.
3. Goiato MC, Pesqueira AA, Ramos da Silva C, Filho HG, Micheline dos Santos D. Patient satisfaction with maxillofacial prosthesis, literature review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 62(2):175-80.
4. Goiato MC, Ribeiro PP, Pellizzer EP, Garcia Júnior IR, Pesqueira AA, Haddad MF. Photoelastic analysis of stress distribution in different retention systems for facial prosthesis. *J Craniofac Surg* 2009; 20(3):757-61.
5. Allen PF, Watson G, Stassen L, McMillan AS. Peri-implant soft tissue maintenance in patients with craniofacial implant retained prostheses. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29(2):99-103.
6. Hooper SM, Westcott T, Evans PLL, Bocca AP, Jagger DC. Implant-supported facial prostheses provided by a maxillofacial unit in a U.K. regional hospital: Longevity and patient opinions. *J Prosthodont* 2005; 14(1):32-8.
7. Gion GG. Surgical versus prosthetic reconstruction of microtia: The case for prosthetic reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64(11):1639-54.
8. Aydin C, Karakoca S, Yilmaz H. Implant-retained digital prostheses with custom-designed attachments: A clinical report. *J Prosthet Dent* 2007; 97(4):191-5.

9. Chang PP, Hansen NA, Phoenix RD, Schneid TR. The effects of primers and surface bonding characteristics on the adhesion of polyurethane to two commonly used silicone elastomers. *J Prosth* 2009; 18(1):23-31.
10. Baima RF. Implant-supported facial prostheses. *J Mich Dent Assoc* 1996; 78(4):50-64.
11. Lemon JC, Chambers MS. Locking retentive attachment for an implant-retained auricular prosthesis. *J Prosthet Dent* 2002; 87(3):336-8.
12. Hatamleh MM, Watts DC. Mechanical properties and bonding of maxillofacial silicone elastomers. *Dent Mater* 2010; 26(2):185-91.
13. Goiato MC, Garcia-Júnior IR, Magro-Filho O, dos Santos DM, Pellizzer EP. Implant-retained thumb prosthesis with anti-rotational attachment for a geriatric patient. *Gerodontology* 2010; 27(3):243-7.
14. Bal BT, Yılmaz H, Aydın C, Karakoca S, Yılmaz S. In Vitro cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: Effect of accelerated aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 89(1):122-6.
15. Polyzois GL, Hensten-Pettersen A, Kullmann A. Effects of RTC-silicone maxillofacial prosthetic elastomers on cell cultures. *J Prosthet Dent* 1994; 71(5):505-10.
16. 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.
17. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *J Prosthet Dent* 2003; 90(2):190-3.
18. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect

of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology* 2007; 24(1):52-7.

19. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont* 1995; 8(2):122-8.

20. Pastore S, Lulli D, Potapovich AI, Fidanza P, Kostyuk VA, Dellambra E, de Luca C, Maurelli R, Korkina LG. Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells. *J Dermatol Sci* 2011; 63(2):104-14.

21. William IR, Kupper TS. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 1996; 58(18):1485-507.

22. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005; 15(11):599-607.

23. Nagase H, Woessner J F Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-4.

24. Gomez DE. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74(2): 111-22.

25. Romi F, Helgeland G, Gilhus NE. Serum Levels of Matrix Metalloproteinases: Implications in Clinical Neurology. *Eur Neurol* 2012; 67(2):121-8.

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(3):340-4.

27. Gonçalves TS, Schmitt VM, Thomas M, de Souza MAL, de Menezes LM. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthodontist* 2008; 78(5):926-30.

28. 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.
29. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: Effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont* 2006; 19(2):195-201.
30. Haddad MF, Goiato MC, Santos DM, Crepaldi Nde M, Pesqueira AA, Bannwart LC. Bond strength between acrylic resin and maxillofacial silicone. *J Appl Oral Sci* 2012; 20(6):649-54.
31. Udagama A. Urethane-lined silicone facial prostheses. *J Prosthet Dent* 1987; 58(3):351-4.
32. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997; 10(1):73-7.
33. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: ISO; 2009.
34. 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.
35. Bernabé DG, Tamae AC, Biasoli ÉR, Oliveira SH. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav Immun* 2011; 25(3):574-83.
36. Oliveira SH, Santos VA. Studies on the expression of fibroblast growth factor-2 from odontoblast-like cells. *J Endod.* 2011; 37(11):1520-4.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Saint Louis: Saunders; 2011. 7th Ed. 560p.

38. 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.
39. Retamoso LB, da Cunha Tde M, Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO, Romanos MT, Tanaka OM. In vitro cytotoxicity of self-curing acrylic resins of different colors. *Dental Press J Orthod* 2014; 19(4):66-70.
40. França DC, de Castro AL, Soubhia AM, Tucci R, de Aguiar SM, Goiato MC. Biocompatibility evaluation of 3 facial silicone elastomers. *J Craniofac Surg* 2011; 22(3):837-40.
41. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2:S3.
42. Tirado-Rodriguez B, Ortega E, Segura-Medina P, Huerta-Yeppez S. TGF- β : an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. *J Immunol Res* 2014; 2014:318481.
43. Santibañez JF1, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121(6):233-51.
44. Bural C, Aktas 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.
45. Saravi ME, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran)* 2012; 9(4):180-8.



Anexos

Normas da revista



Biomaterials

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

Ethics in Publishing: For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/authorethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Changes to authorship This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the

corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Mandatory Author Declaration: In addition to uploading the manuscript, it is required that the corresponding author of each manuscript uploads a separate Author Declaration. All authors must sign this declaration; the corresponding author may not sign on behalf of other authors.

This Declaration covers a number of logistic and ethical issues. Please use the template given above for this Declaration. Authors may save this template, obtain the required signatures and then upload it as an integral part of their submission. The editorial process will not begin until and unless all authors have signed the declaration.

N.B.: The Author Declaration is independent of, and in addition to, the "Journal Publishing Agreement" agreement which is issued on acceptance.

Amendments to Manuscripts In order to maintain the integrity of the scientific record, the version that is published in an issue on ScienceDirect and in print MUST be identical. One set of page proofs will be sent to the corresponding author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, but corrections are restricted to typesetting errors only. Proofs are NOT to be considered as drafts. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the corresponding author.

Copyright All authors must sign the "Journal Publishing Agreement" before the article can be published. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with an agreement form or a link to the online version of this agreement. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Role of the Funding Source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding Bodies Agreements and Policies Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as

conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse • An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder *2. Subscription* • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>) • No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC-BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a

way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 3300, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy:<http://www.elsevier.com/openaccesspricing>

MANUSCRIPT PREPARATION

General Manuscripts must be word processed (preferably in Word format). Please avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. The preferred style is: Surname, Initials, Department, Institution, City/State, Postal Code, Country. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

English Language Manuscripts should be proof-read and have English language errors corrected before submission as we may have to return papers due to poor language usage. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit

<http://www.elsevier.com/languagepolishing> for more information.

Paper Length Authors are urged to write as concisely as possible.

Abstracts All manuscripts are to be supplied with an Abstract of about 100-200 words in length.

Units The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and must not be used. If a large number of symbols are used it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be

highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Text Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Appendix (where necessary), Figures, Figure Captions and Tables, Supplementary Data. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. An abbreviated title for use as a running headline should also be supplied. Authors are requested to acknowledge funding sources for the work.

Keywords Authors must provide 4-6 keywords for indexing purposes. A keyword list can be found at the end of these instructions.

Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Electronic artwork *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
- TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
- TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
- TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized

for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low. • Supply files that are too low in resolution. • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Video Data Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video

file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. Files can be stored on diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh).

Reference formatting There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: 1. Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, Planell JA. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *J Mater Sci: Mater Med* 1993;4:503-508. 2. Nancollas H. In vitro studies of calcium phosphate crystallisation. In: Mann S, Webb J, Williams RJP, editors. *Biomaterialization. Chemical and biochemical perspectives*. New York: VCH, 1989. p. 157-182. 3. Brown W, Chow

LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patent No. 4612053, 1986.

N.B.: 'Et al' must be used after the first 6 authors have been named. *Biomaterials* does not use the publication month or day.

Online Sources: References to online sources, including articles in press, should contain at a minimum the full URL and year the source was accessed. Furthermore, if known, the following information should be given: author names, dates, reference to a source publication. Examples of formatting of online sources follow: 1. UK House of Commons Science and Technology Committee. Scientific Publications: Free for All? Tenth Report of Session 2003-4 Volume 1. London: The Stationary Office Ltd. Online. 2004 July. Available from URL: <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmsctech/399/39902.htm> 1 2. Wellcome Trust. Economic Analysis of Scientific Research Publishing. Histon, UK: Wellcome Trust. Online. 2003. Available from URL: http://www.wellcome.ac.uk/doc_wtd003181.html 3. Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2011. Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531126> (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.04.003).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. **Ensure that the following items are present:** One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address • Telephone All necessary files have been uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Audio Slides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data in Brief Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Data in Brief may be submitted directly to the Journal of Proteomics alongside a research article. Authors are encouraged to convert their supplementary data into a Data in Brief article when they submit a revised version of their manuscript to the Journal of Proteomics. If your

research article is accepted, your Data in Brief article will also be published in the new, open access journal, Data in Brief. The Open Access fee for Data in Brief in 2015 is \$250. Please directly contact the publisher at dib@elsevier.com (please use the subject line "DIB waiver request") to request any need-based waivers or discounts. Please use the following template to write your Data in Brief.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs: One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author and should be returned within 48 hours of receipt. The average amount of time between acceptance and receipt of typeset proof is 6 working days. Papers are published in print within another 8 weeks upon receipt of author corrections. Corrections should be restricted to typesetting errors. Any queries should be answered in full. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return.

Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader© version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do

everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Track a Paper: Authors can track their paper status online after the paper has been accepted and forwarded to the Publisher. Enter your Elsevier reference number (JBMT xxx) and the Corresponding author's family name at the following web page: <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Corresponding authors will receive an acknowledgement email from Elsevier with the reference number and the family name on it. Authors can also go to the 'track a paper' page by clicking onto the 'track a paper' button on the left hand side of the journal home page.

Offprints: The corresponding author will be provided with a PDF of the article via email. The PDF is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Author Enquiries: For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.