

EMILY VIVIANNE FREITAS DA SILVA

**Biocompatibilidade da resina acrílica de prótese ocular:
análise *in vitro* e *in vivo***

Araçatuba

2018

EMILY VIVIANNE FREITAS DA SILVA

**Biocompatibilidade da resina acrílica de prótese ocular:
análise *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Titular Marcelo Coelho Goiato

Coorientadoras: Profa. Titular Sandra Helena Penha de Oliveira e Profa. Adjunta Daniela Micheline dos Santos

Araçatuba

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586b Silva, Emily Vivianne Freitas da.
Biocompatibilidade da resina acrílica de prótese ocular :
análise in vitro e in vivo / Emily Vivianne Freitas da Silva . -
Araçatuba, 2018
110 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Marcelo Coelho Goiato
Coorientador: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira
Coorientador: Profa. Daniela Micheline dos Santos

1. Olho artificial 2. Resinas acrílicas 3. Citotoxicidade
imunológica 4. Teste de Materiais I. T.

Black D3
CDD 617.69

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550



Dedicatória

Dedicatória

Aos meus pais Rubem e Benedita,

gostaria de dedicar este Doutorado a eles, como agradecimento por toda a dedicação e incentivo com a minha educação e formação pessoal. Os meus pais sempre demonstraram amor incondicional por mim, foram meus primeiros e eternos professores, sempre presentes e carinhosos e fizeram tudo o que estava ao seu alcance para que eu chegasse aqui. Eles foram grandes incentivadores durante todo o processo e abraçaram o meu sonho como seus, portanto essa conquista também é deles.

*Agradecimentos
Especiais*

Agradecimentos Especiais

"Se fosse preciso, começaria tudo outra vez do mesmo jeito, andando pelo mesmo caminho de dificuldades, pois a fé, que nunca me abandona, me daria forças para ir sempre em frente"

Irmã Dulce

Agradeço infinitamente a **Deus**, pelo dom da vida, pela minha saúde e por ter permitido que eu vivesse essa caminhada. Agradeço pela Sua proteção e amor e por todas as oportunidades, aprendizados, dificuldades e momentos de alegria, pois me ajudaram a chegar aqui. Sou muito grata por minha família e amigos maravilhosos que Ele colocou no meu caminho para tornar essa jornada mais leve.

Acredito que essa caminhada teria sido impossível sem Ele ao meu lado e que o estudo da Palavra, ao longo desses anos, me deu força e me ajudou a ser um ser humano melhor. Ele disse: *"Lembre da minha ordem: 'Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o SENHOR, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!'"* (Josué 1:9).

"Se houver amor em sua vida, isso pode compensar muitas coisas que lhe fazem falta.

Caso contrário, não importa o quanto tiver, nunca será o suficiente"

Friedrich Nietzsche

Agradeço aos meus pais **Rubem e Benedita**, por todo o amor que me dão e por sempre colocarem a minha felicidade à frente da deles, me proporcionando um crescimento rodeado de carinho e dedicação. Sem dúvidas Deus não poderia ter me proporcionado uma família melhor. Agradeço pela educação preciosa que tive, pelas orientações e conselhos, para que eu me tornasse uma pessoa melhor a cada dia. Vocês são grandes inspirações na minha vida, exemplos de pais, avós, amigos, pessoas batalhadoras, honestas e atenciosas.

Muito obrigada por todo o orgulho e carinho que demonstram ter por mim, mas saibam que orgulho muito maior é o meu por vocês. Sou muito grata por acreditarem no meu sonho e me ajudarem a alcançá-lo. Obrigada por estarem sempre presentes mesmo com a distância em quilômetros. Espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

Agradeço também ao meu amado irmão, **Vinícius**, por todo o carinho e amizade ao longo da minha vida. Quando eu nasci, você já estava aqui, me orientando e protegendo e não é à toa que se tornou um pai incrível. Obrigada por estar presente sempre que preciso, pelos conselhos, pela preocupação e pelos momentos leves e descontraídos que temos. Amo vocês!

"O amor nada mais é do que a conquista de nós próprios no outro"

Friedrich Hebbel

Ao meu grande companheiro **Dante**, o grande amor da minha vida, que sempre apoiou as minhas decisões e me ajudou a conquistar esse sonho como se fosse dele próprio. Agradeço por ter sido um grande incentivador e por ter estado ao meu lado ao longo desses anos de pós-graduação e nos anos antes disso, sendo um grande amigo, ouvinte e conselheiro. Obrigada por ter compreendido tão bem a minha ausência, ansiedade e nervosismo em diversos momentos, com tranquilidade, respeito e paciência. Eu sou muito grata por ter você em minha vida, pelos nossos momentos juntos, por todos os conselhos e pelo suporte nos momentos mais difíceis.

Fico muito feliz por termos chegado até aqui e com nossos planos futuros, pois sei que viver ao seu lado é uma grande oportunidade de aprendizado sobre dedicação, integridade, humildade, generosidade e amor. Agradeço muito por tudo e espero poder recompensá-lo a cada dia. Amo você!

"Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa"

Albert Einstein

Ao meu orientador Professor **Marcelo Coelho Goiato**, por toda atenção e paciência dedicada desde que cheguei nessa universidade. Agradeço por ter me aceitado como sua aluna desde o Mestrado, por ter acreditado em mim e pelas oportunidades que me proporcionou. Obrigada pelos conselhos que o senhor me deu e por ter me orientado para que eu chegasse até aqui. Seu jeito descontraído e calmo de orientar possibilitou que eu melhorasse o meu currículo, mas, acima de tudo, que eu crescesse como pessoa. Obrigada por me ajudar a realizar essa conquista e por estar na torcida e me apoiar para que eu alcance o meu sonho profissional.

À minha coorientadora Professora **Sandra Helena Penha de Oliveira**, pela receptividade no seu departamento, pela orientação e conselhos. Agradeço pela nossa amizade, pelos ensinamentos transmitidos e carinho. Sou muito grata pela oportunidade de trabalhar com a sua equipe e com a senhora, uma profissional competente e dedicada. Obrigada por ter me acolhido, pois, sem a sua colaboração, esse trabalho não seria possível. A você, toda a minha gratidão e admiração.

À minha coorientadora Professora **Daniela Micheline dos Santos**, pelo auxílio e amizade nessa caminhada. Dani, muito obrigada por toda a ajuda, conselhos e carinho. Agradeço pela oportunidade de aprender com seu conhecimento e dedicação à profissão. Posso dizer que você se tornou, além de uma professora querida, uma amiga ao longo desses anos, me ouvindo e ajudando em todos os momentos, torcendo pelo meu sucesso

e me incentivando diariamente. Sou eternamente grata pela sua amizade, cuidado, conselhos e ensinamentos.

Ao meu supervisor durante o estágio no exterior **Professor Yoav Finer**, por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa e por todo o auxílio e atenção que recebi na Universidade de Toronto. Agradeço pelas oportunidades que me proporcionou, pelos ensinamentos e paciência.

Aos professores **Glauco Miyahara, Karina Turcio, Marcela Haddad e Rodrigo Medeiros**, que compõem a minha **banca examinadora**, por terem prontamente aceitado o meu convite e por me proporcionarem o privilégio de compartilhar os seus conhecimentos comigo. Obrigada pela disponibilização de tempo e pela atenção despendida na análise deste trabalho, uma etapa importante da minha formação acadêmica.



Agradecimentos

Agradecimentos

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”

Nelson Mandela

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, na pessoa de seu Diretor, Professor Wilson Roberto Poi, e do coordenador do programa de pós-graduação em Odontologia, Professor André Luiz Fraga Briso, pela oportunidade de aprendizado e realização do curso de Doutorado. Agradeço pela dedicação para o crescimento da faculdade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo n. 2015/20221-7), pelo financiamento do meu Doutorado, pela bolsa concedida durante todo o período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido sob forma de projeto de pesquisa (Processo n. 2016/03455-7), favorecendo a aquisição do material utilizado para a realização do trabalho.

À Universidade Federal da Bahia, Instituição onde fiz a minha graduação em Odontologia, pelo aprendizado e oportunidades que me foram proporcionadas. Agradeço pelas monitorias, grupos de pesquisa e iniciações científicas que participei, onde pude despertar o interesse pela formação acadêmica. Agradeço especialmente às professoras **Paula Mathias Rabelo de Moraes e Blanca Liliane Torres León**, grandes orientadoras, profissionais extremamente competentes e, queridas amigas e conselheiras.

"Tem gente que lança sobre a gente uma amizade tão forte, que a sua palavra é direção. Essa amizade rega amor em nosso coração e conquista o seu espaço. De perto, de longe. Tem gente que semeia carinho, cuidado, atenção e vai e volta pra nossa vida sem nunca ter saído dela. Essa gente está cada vez mais rara e, quanto mais eu cresço, mais valor eu tenho dado as amizades que permanecem "

Edgard Abbehusen

À minha família e à de Dante, por todo o amor, cuidado e carinho que sempre dedicaram a mim. Agradeço especialmente à minha avó **Lourdes**, por todas as orações e preocupação. Obrigada aos meus tios e primos pelo apoio e momentos maravilhosos. Sou muito grata à esposa de Vinícius, **Carla**, profissional competente e grande incentivadora da minha profissão e por eles terem colocado **Liz** em nossas vidas, a quem eu amo muito e que desperta o melhor de mim com o seu jeito doce e alegre.

Aos amigos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, especialmente aos colegas de pós-graduação. À **Betina Commar**, pela amizade, por toda a ajuda, carinho e por sempre ter me tratado tão bem. À **Cecília Souza**, por ser tão educada e querida. À **Fernanda Caxias**, por ser tão solícita e responsável. À amiga **Hiskell Fernandes**, por ser sempre tão amável, ótima ouvinte e tão carinhosa. À querida amiga **Jéssica Gomes**, pelo companheirismo, carinho, conselhos e ótimos momentos juntas. À **Letícia Mazza**, pela amizade, momentos de alegria e descontração. À **Lisiane Bannwart**, pelos conselhos e por compartilhar suas experiências. À **Marcio Campaner**, pela amizade alegre e por ser tão solícito. À **Paulo Penitente**, pela participação na execução desse trabalho, sendo sempre tão educado e prestativo. Aos colegas mais recentes **Clóvis Lamartine**, **Isabela Ervolino** e **Juliana Brunetto**, pela convivência diária e carinho.

Agradeço imensamente ao meu amigo **Sandro Bitencourt**, que assumiu essa pesquisa como se fosse dele e me ajudou muito durante esse processo. Sou muito grata pela sua amizade, carinho e preocupação comigo. Sem a sua ajuda eu não estaria aqui hoje. Obrigada pelos dias e noites perdidos em experimentos e por ter muitas vezes adiado seus planos por essa pesquisa. Agradeço por me ouvir, aconselhar e acolher as minhas angústias e preocupações, sendo sempre tão querido e educado.

À **Mariana Vilela**, pela amizade e companheirismo. Iniciamos essa jornada juntas e estamos encerrando juntas, portanto agradeço por todos os momentos que compartilhamos. Obrigada por ser sempre tão boa ouvinte nas horas mais difíceis.

Agradeço aos colegas que já passaram por aqui, **Adhara Nobrega, Agda Marobo, Aljomar Vechiato, Amália Moreno, Caroline Cantieri, Marcela Borghi, Marcela Haddad, Murilo Laurindo-Júnior, Victor Batista**, pela amizade e pelos momentos de alegria. Agradeço especialmente aos meus amigos **Liliane Bonatto, Rodrigo Medeiros e Bruna Nagay**. Eles foram grandes companheiros durante essa jornada, estiveram ao meu lado nos momentos descontraídos e, principalmente, me ajudaram nos momentos mais difíceis e torceram pelas minhas conquistas. São profissionais dedicados e competentes, a quem desejo muito sucesso e felicidades e sei que são amigos eternos. Com certeza, esse processo teria sido mais difícil sem eles ao meu lado. Realmente não sei se estaria aonde estou hoje sem vocês.

Torço muito pelo sucesso de vocês e para que se realizem profissionalmente.

Agradeço imensamente aos amigos do Departamento de Farmacologia, **Ayná Barreto, Beatriz Ballassoni, Bianca Ribeiro, Bruno Moreno, Carolina Linjardi, Caroline Shibuya, Jéssica Troiano, José Vitor, Mariana Sousa, Milena Nunes, Murilo Graton, Rodrigo Cano, Simone Potje e Sabrina Frasnelli**. Em especial, gostaria de agradecer a **Victor Balera**, pela amizade e por todo o apoio para que esse

trabalho fosse realizado. Obrigada por ter me ajudado tanto, pelos momentos descontraídos e ensinamentos compartilhados. Agradeço a todos por me receberem tão bem no seu departamento de trabalho, por estarem sempre dispostos a ajudar e por tornarem essa jornada mais leve.

Agradeço aos amigos da Universidade de Toronto pela convivência agradável, ensinamentos e paciência. Em especial, aos amigos **Janaina Bortolatto**, **Cameron Stewart** e professora **Grace Souza**, pelo carinho, ajuda e por terem tornado a minha estadia no Canadá muito prazerosa e feliz.

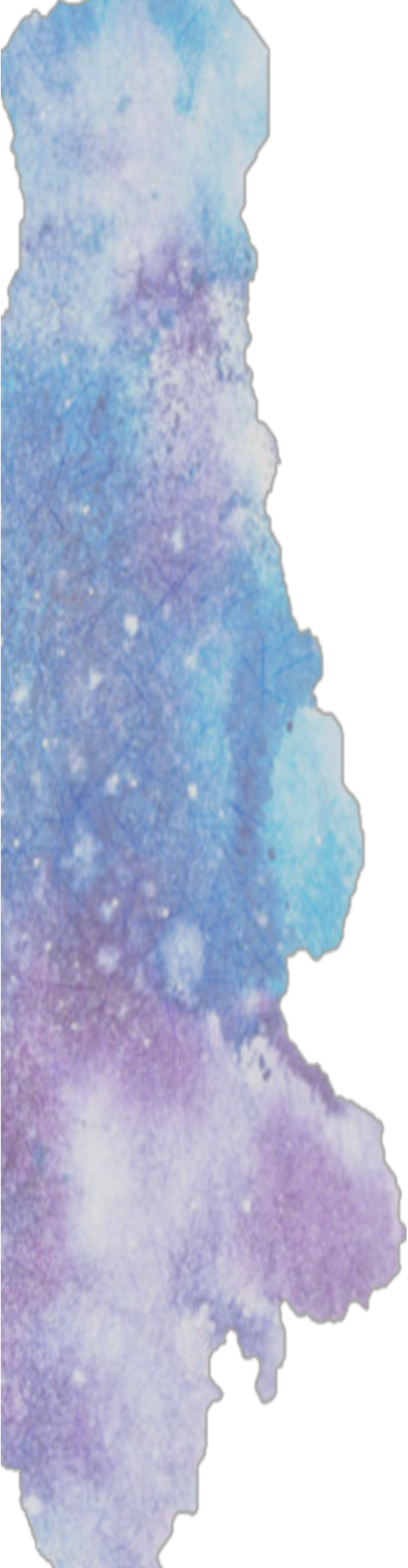
Aos professores Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Dentária, em especial à **Aimée Guiotti**, **Aldiéris Pesqueira**, **Eduardo Pellizzer**, **Fellippo Verri**, **Humberto Gennari**, **Karina Turcio** e **Paulo Zuim**, e ao professor do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Leonardo Faverani**. Agradeço por toda a ajuda e conselhos durante a pós-graduação. Obrigada pelos ensinamentos, pelo respeito e por compartilharem as suas experiências comigo. Agradeço à professora **Aline Takamiya**, por toda a ajuda na execução dessa pesquisa e pelos ensinamentos compartilhados. Sou grata por sua dedicação e torço pelo seu sucesso.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Dentária, em especial a **Magda Raquena**, pelo apoio e convívio agradável durante essa caminhada. Obrigada por toda contribuição no meu crescimento profissional.

Às funcionárias da seção de pós-graduação, **Valéria Zagatto**, **Cristiane Lui** e **Lilian Mada**, obrigada pelo apoio e orientações a mim dispensados.

Aos meus amigos de colégio, graduação, trabalho e a todos os outros, agradeço por todos os anos de amizade, mesmo à distância. Obrigada pelos conselhos, apoio e preocupação. Vocês são muito especiais e são uma extensão da minha família.

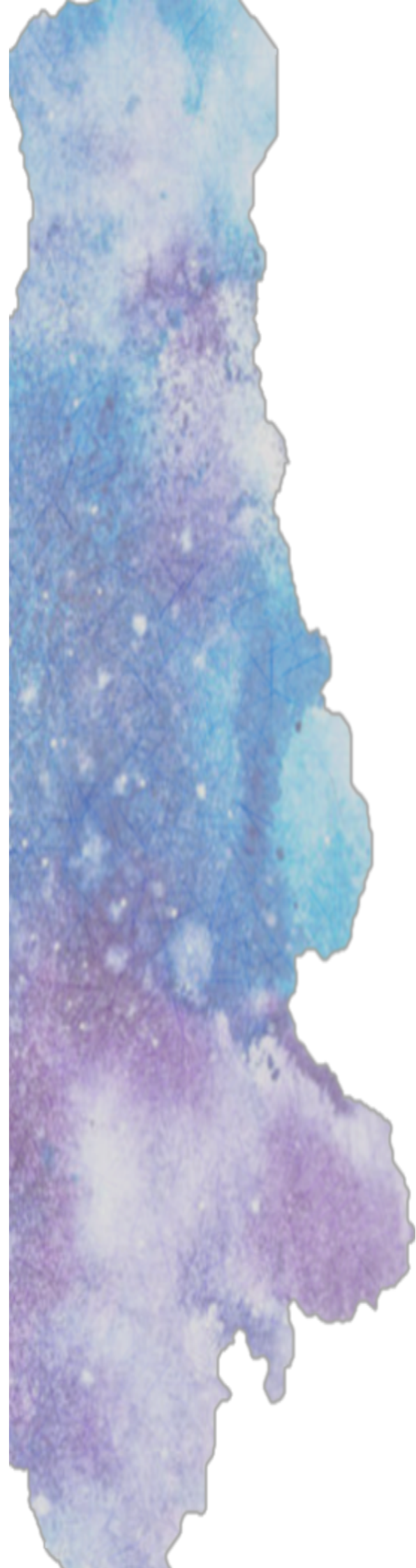
À todos vocês, meu muito obrigado.



Epigrafe

*“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério;
é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”*

Geraldo Eustáquio de Souza



Resumo

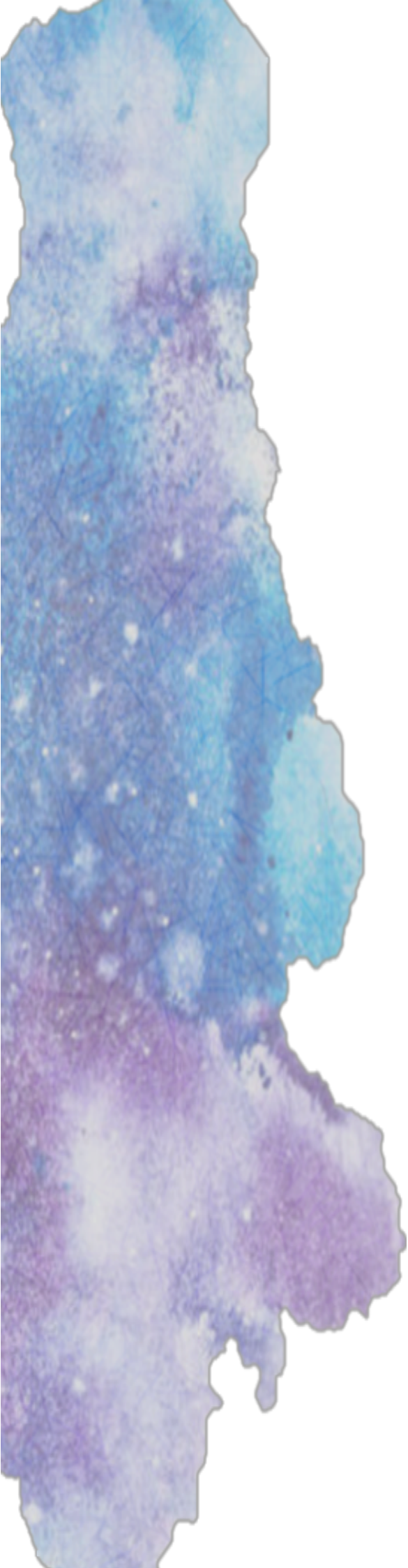
SILVA, EVF. **Biocompatibilidade da resina acrílica de prótese ocular: análise *in vitro* e *in vivo***. 110 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência de diferentes ciclos e métodos de polimerização da resina acrílica (RA) branca de próteses oculares sobre a biocompatibilidade de células da conjuntiva humana e resposta inflamatória do tecido subcutâneo de ratos. Para isso, foram confeccionados corpos de prova em RA termopolimerizados em água aquecida (RNAA), por energia de microondas (RNTM) e quimicamente ativados (RNQA). Para a análise *in vivo*, a resposta inflamatória desses 3 grupos (n=20/grupo) foi avaliada no tecido subcutâneo de 20 ratos Wistar por 7, 15, 30 e 60 dias (d). Células inflamatórias foram contadas no tecido adjacente ao corpo de prova após coloração com hematoxilina e eosina. A análise imunohistoquímica foi realizada para a detecção de IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-17 e CCL20. Para a análise *in vitro*, diferentes ciclos de polimerização para cada método citado foram avaliados, totalizando 11 grupos (n=8/grupo). Foram realizadas análises de grau de conversão (GC), MTT, Alamar Blue, ELISA, RT-PCR em tempo real e dupla marcação de Anexina V e iodeto de propídio. Dados quantitativos foram submetidos à Análise de Variância e ao teste de Tukey com significância de 5%. Os resultados qualitativos foram comparados visualmente. Na análise *in vivo*, houve infiltrado inflamatório moderado para os grupos RNTM e RNQA e leve para o grupo RNAA após 7 d. O infiltrado inflamatório e a imunomarcação dos alvos testados diminuiu gradativamente ao longo dos 60 d. O grupo RNTM exibiu mais células inflamatórias, com exceção do grupo RNAA, que apresentou mais eosinófilos e

linfócitos após 15 d, e do grupo RNQA, onde foi observado mais macrófagos em 15 d e neutrófilos em 60 d. Os grupos RNAA e RNQA apresentaram maior imunomarcação de IL-1 β após 7 d. O grupo RNQA apresentou maior imunomarcação de IL-1 β (15 e 30 d), IL-6 (30 e 60 d), IL-17 (15 e 30 d) e TNF- α (7 d). Os grupos RNAA e RNTM apresentaram maior imunomarcação de TNF- α nos períodos de 15 e 30 d, enquanto o grupo RNTM, aos 60 d. Na análise *in vitro*, todos os grupos apresentaram proliferação celular maior que 75%. O ciclo longo de polimerização em microondas apresentou menor GC e percentual de proliferação celular no MTT e resultou em grande liberação de IL-2. No ensaio de Alamar Blue, esse grupo apresentou baixo percentual de proliferação celular, assim como o grupo que recebeu ciclo longo de polimerização em água aquecida e grupos submetidos à ativação química. Maior liberação de IL-6 foi observada nos grupos submetidos à ativação química e de IL-23 para o ciclo curto de polimerização em microondas. Maior expressão gênica de TGF β 1 ocorreu para o grupo que recebeu ciclo longo de polimerização em água aquecida seguido de 30 min de armazenamento em água. Maior expressão gênica de CASP9 ocorreu para o grupo ativado quimicamente sobre a bancada. Pode-se concluir que os métodos de polimerização por meio de energia de microondas (ciclos longo e curto) e por ativação química desencadearam uma resposta inflamatória mais intensa. Dentre os métodos de polimerização recomendados pelo fabricante, a polimerização em água aquecida apresentou resultados mais satisfatórios.

Palavras-chave: Olho artificial. Resinas acrílicas. Citotoxicidade imunológica. Teste de materiais.



Abstract

SILVA, EVF. **Biocompatibility of ocular prosthesis acrylic resin: *in vitro* and *in vivo* analysis.** 110 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of different cycles and methods of white color acrylic resin (AR) for ocular prosthesis on the biocompatibility of human conjunctival cells and on the inflammatory response of rat subcutaneous tissue. For this, AR specimens were prepared in water bath (NRWB), by microwave energy (NRME), and chemically activated (ANR). For *in vivo* analysis, the inflammatory response of these 3 groups (n=20/group) was assessed in subcutaneous tissue of 20 Wistar rats at 7, 15, 30 and 60 days (d). Inflammatory cells were counted in the tissue adjacent to specimen after staining with hematoxylin and eosin. The immunohistochemical analysis was performed for the detection of IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-17, and CCL20. For *in vitro* analysis, different cycles of polymerization for each method were evaluated, with a total of 11 groups (n=8/group). The degree of conversion (DC), MTT, ELISA, real-time RT-PCR and Annexin V and propidium iodide assays were performed. Quantitative data were submitted to Analysis of Variance and Tukey test with a 5% significance. Qualitative data were submitted to visual comparison. In *in vivo* analysis, there was a moderate inflammatory infiltrate for groups NRME and ANR, and a light infiltrate for the group NRWB after 7 d. The inflammatory infiltrate and the immunolabeling of tested targets decreased gradually during the 60 d. The group NRME exhibited the highest number of inflammatory cells, except for the group NRWB, which presented a higher number of eosinophils and lymphocytes after 15 d, and for the group ANR, where a higher number

of macrophages and neutrophils were observed at 15 d and at 60 d, respectively. Groups NRWB and ANR showed higher IL-1 β immunolabeling after 7 d. The group ANR had the highest immunolabeling of IL-1 β (15 and 30 d), IL-6 (30 and 60 d), IL-17 (15 and 30 d), and TNF- α (7 d). Groups NRWB and NRME showed greater immunolabeling in the periods of 15 and 30 d, while the group NRME had also high results at 60 d. In *in vitro* analysis, all groups showed cell proliferation higher than 75%. The long cycle of polymerization using microwave energy resulted in lower DC and lower percentage of cell proliferation in the MTT assay and in large release of IL-2. In the Alamar Blue assay, this group had a low percentage of cell proliferation, as well as the group that received a long cycle of polymerization in water bath and groups submitted to chemical activation. A higher release of IL-6 was observed in groups submitted to chemical activation and of IL-23, for the short cycle of polymerization in microwave. Higher TGF β 1 gene expression occurred for the group that received long cycle of polymerization in water bath followed by 30 min of storage in water. Higher CASP 9 gene expression occurred for the chemically activated group on bench. It can be concluded that the polymerization by microwave energy (long and short cycles) and by chemical activation resulted in higher inflammatory response. Among methods recommended by the manufacturer, the water bath polymerization showed more satisfactory results.

Keywords: Ocular prosthesis. Acrylic resins. Cellular immune response. Biocompatibility testing.



Listas e Sumário

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

- Figura 1 - Imagem representativa do corte histológico do tecido subcutâneo de ratos corados por meio de coloração hematoxilina-eosina. Infiltrado inflamatório leve (A-D, F-H, J-L) e moderado (E, I) (magnificação 40×). 57
- Figura 2 - Número e desvio padrão de mastócitos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$)..... 58
- Figura 3 - Número e desvio padrão de eosinófilos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$)..... 59
- Figura 4 - Número e desvio padrão de linfócitos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$)..... 60
- Figura 5 - Número e desvio padrão de macrófagos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no

	mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam	61
	diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).....	
Figura 6 -	Número e desvio padrão de neutrófilos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).....	62
Figura 7 -	Imagem representativa da imunomarcção de IL-1 β nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20 $\times$).....	63
Figura 8 -	Análise imunohistoquímica para IL-1 β nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).....	64
Figura 9 -	Imagem representativa da imunomarcção de IL-6 nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20 $\times$).....	65
Figura 10 -	Análise imunohistoquímica para IL-6 nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).....	66
Figura 11 -	Imagem representativa da imunomarcção de IL-17 nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20 $\times$).....	67
Figura 12 -	Análise imunohistoquímica para IL-17 nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença	

	estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).....	68
Figura 13 -	Imagem representativa da imunomarcção de TNF- α nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20 $\times$).....	69
Figura 14 -	Análise imunohistoquímica para TNF- α nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).....	70
Figura 15 -	Imagem representativa da imunomarcção de MIP-3 α nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 10 $\times$).....	71
Figura 16 -	Análise imunohistoquímica para MIP-3 α nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).....	72
Figura 17 -	Imagem representativa do controle negativo da imunomarcção anti-cabra.....	73
Figura 18 -	Imagem representativa do controle negativo da imunomarcção anti-coelho.....	74

CAPÍTULO II:

Figura 1 -	Percentuais $\pm$ desvio padrão de grau de conversão para os diferentes grupos testados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....	100
Figura 2 -	Percentuais de proliferação celular obtidos nos ensaios de MTT e Alamar Blue para os diferentes grupos testados. 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.....	101
Figura 3 -	Concentração de IL-2 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos avaliados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....	102
Figura 4 -	Concentração de IL-6 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos avaliados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....	103
Figura 5 -	Concentração de IL-23 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos avaliados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....	104
Figura 6 -	Quantificação relativa de RNAm para TGF β 1 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos testados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....	105
Figura 7 -	Quantificação relativa de RNAm para CASP9 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos testados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....	106
Figura 8 -	Gráfico em barra quantificando o percentual de células da conjuntiva vivas (Anexina V negativo/PI negativo), em estágio de apoptose inicial (Anexina V positivo/PI negativo) e, em estágio de apoptose tardia/necrose (Anexina V positivo/PI positivo), de acordo com os tratamentos testados...	107

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO I:**

Tabela 1 -	Material, composição química e ciclo de polimerização dos materiais utilizados.....	56
------------	---	----

CAPÍTULO II:

Tabela 1 -	Ciclos de polimerização utilizados no estudo.....	97
Tabela 2 -	Concentração (pg/mL) dos mediadores inflamatórios avaliados no ELISA.	98

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

RA - resina acrílica

MMA - metacrilato de metila

h - hora(s)

Mcl-1 - proteína de sequência 1 de Leucemia de Células mieloides

COL IV - colágeno tipo IV

MMP9 - metaloproteinase de matriz 9

TGF - fator de transformação do crescimento

β - beta

RNAA - resina acrílica N1 termopolimerizada em água aquecida

RNTM - resina acrílica N1 termopolimerizada por energia de microondas

RNQA - resina acrílica N1 quimicamente ativada

d - dia(s)

IL - interleucina

TNF - fator de necrose tumoral

α - alpha

MIP - proteína inflamatória de macrófago

% - percentual

n - número

mm - milímetro(s)

kgf - quilograma-força

min - minuto(s)

mg - miligrama(s)

kg - quilograma(s)

PVPI - solução de Povidina-iodo

HE - hematoxilina e eosina

× - vezes

IHQ - imunohistoquímica

Ig - imunoglobulina

ABC - complexo de avidina-biotina

DAB - Diaminobenzidina

seg - segundo(s)

ANOVA - análise de variância

Macrófagos M2 - macrófagos "alternativamente" ativados

°C - graus Celcius

W - Watts

µm - micrômetro(s)

GC - grau de conversão

MTT - 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio

CAS - caspase

FT-IR - espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

ELISA - ensaio imunoabsorbente de ligação enzimática

RT-PCR - reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

P - polimerização

cm - centímetro(s)

SFB - soro fetal bovino

mL - mililitro(s)

µg - micrograma(s)

CO₂ - gás carbônico

μL - microlitro(s)

nm - nanômetro(s)

GM-CSF - fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

IFN - interferon

γ - gama

CT - cycle threshold

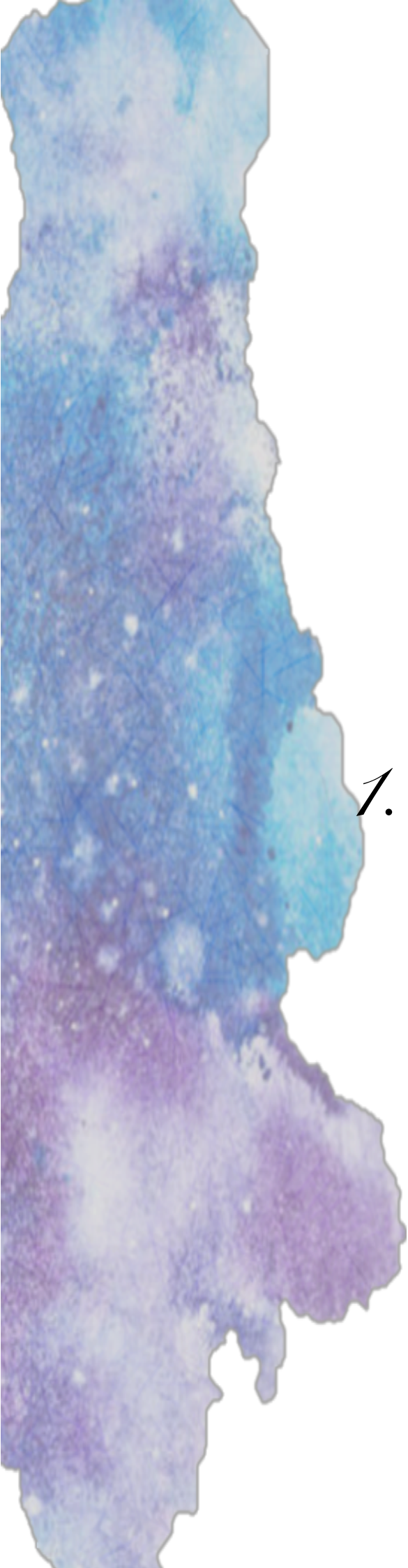
PI - iodeto de propídio

ng - nanograma(s)

pg - picograma(s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	36
2 CAPÍTULO I - Avaliação da resposta inflamatória do tecido subcutâneo de ratos à diferentes métodos de polimerização da resina acrílica branca de próteses oculares	41
2.1 Resumo	41
2.2 Introdução	42
2.3 Materiais e Métodos	43
2.4 Resultados	46
2.5 Discussão	48
2.6 Conclusão	50
2.7 Referências	51
3 CAPÍTULO II - Biocompatibilidade de diferentes métodos e ciclos de polimerização da resina acrílica branca: análise <i>in vitro</i> em células da conjuntiva humana	76
3.1 Resumo	76
3.2 Introdução	77
3.3 Materiais e Métodos	79
3.4 Resultados	84
3.5 Discussão	85
3.6 Conclusão	89
3.7 Referências	89
4 ANEXOS	109
Anexo A - Comitê de Ética	109
Anexo B - Norma da revista selecionada para a publicação dos artigos	110



1. Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A prótese ocular é uma opção de tratamento para indivíduos anoftálmicos, visando reestabelecer a estética facial e a autoestima e favorecer a reintegração do indivíduo na sociedade. A prótese permite restaurar e manter a saúde das estruturas remanescentes e é composta em maior volume por resina acrílica (RA) branca, para a simulação artificial da esclera e, em menor quantidade por incolor, para o recobrimento da caracterização da prótese. Quanto aos métodos de polimerização, a RA pode ser termopolimerizada em água aquecida ou por energia de microondas e, ativada quimicamente.

A polimerização deste material, que consiste em um pó de polímero de metacrilato de metila (MMA) e um líquido de monômero de MMA, permite a conversão de monômeros em polímeros, com a otimização de suas propriedades físicas. Diversas substâncias potencialmente tóxicas podem ser liberadas quando reações incompletas de polimerização ocorrem, como formaldeído, ácido benzóico, ácido metacrílico, salicilato de fenila, dibutilftalato, benzoato de fenila e monômeros residuais de MMA.

Diferentes ciclos e métodos de polimerização da RA foram previamente avaliados, além do proposto pelo fabricante, quanto à sua influência nas características estéticas e mecânicas do material. Contudo, o comportamento biológico do material foi avaliado em RA de prótese total e ocular, porém sem comparação entre ciclos e métodos de polimerização.

O armazenamento da prótese em água por 24 h, previamente à instalação no indivíduo, é recomendado visando a liberação do monômero residual e a redução da irritação da mucosa. Contudo, a liberação de monômero pode ser contínua, mesmo após a polimerização do material recomendada pelo fabricante, podendo ocorrer por anos.

Dentre os fatores envolvidos no sucesso da reabilitação protética, é essencial que o material artificial utilizado possua a capacidade de não provocar efeitos indesejáveis no

indivíduo que o recebe. Essa qualidade consiste na biocompatibilidade do material. Diversos autores relatam a irritação física na cavidade anoftálmica associada ao uso de próteses oculares, devido ao material e ao processo utilizados para a confecção da prótese. Sabe-se que a irritação da mucosa oral é o efeito local mais severo associado à RA. Contudo, a mucosa mastigatória é queratinizada, o que está associado à maior resistência a substâncias tóxicas, diferentemente da conjuntiva ocular, que não é queratinizada. Portanto, o comportamento da exposição à RA é potencialmente mais tóxico nessas condições, sendo de suma importância entender como esse processo ocorre.

Os trabalhos de citotoxicidade presentes na literatura abordam, em regra, resinas termopolimerizadas de ciclo longo. Contudo, muitos profissionais utilizam resinas termopolimerizadas de ciclo curto, como a que será utilizada no presente estudo, inclusive para a confecção de próteses oculares. Visto que esse material é bastante utilizado, devido as vantagens de maior rapidez na sua confecção, quando comparado às resinas de ciclo longo, diferentes métodos e ciclos de polimerização do mesmo devem ser avaliados, visando identificar o que possui maior biocompatibilidade, para garantir a segurança na sua utilização. Com relação à resina polimerizada por energia de microondas, é interessante avaliá-la devido a rapidez e praticidade na sua confecção, com o objetivo de estabelecer o tempo mínimo para a obtenção de resultados satisfatórios, pois a citotoxicidade do material pode ser influenciada pelos parâmetros de tempo e potência do microondas. É ainda importante avaliar se é possível reduzir a toxicidade causada pela resina autopolimerizada, visto que é a que permite a confecção da prótese em menor tempo e permitiria pequenas correções e reembasamentos da prótese ocular na clínica.

Testes *in vitro* são essenciais para garantir a utilização dos materiais odontológicos em seres humanos com segurança, pois permitem a avaliação do comportamento celular na ausência da complexidade do organismo vivo. Além da

atividade citotóxica do material, também deve-se analisar a produção de mediadores que participam da inflamação, uma reação de resposta do organismo frente a um agente invasor que, quando em excesso, pode provocar danos irreversíveis. Por conta disso, é importante avaliar a capacidade das próteses oculares de induzir a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e o seu mecanismo de ativação, atuação e atividade quimiotática. Esses mediadores secretados em condições de resposta inflamatória incluem o padrão de citocinas Th1, de atuação pró-inflamatória, e Th2, de ação anti-inflamatória. Os principais mediadores secretados em condições de resposta inflamatória aguda incluem IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Adicionalmente, é essencial o estudo da morte celular induzida pelas próteses oculares, visto que esse fenômeno pode ser causado pela presença de monômeros residuais provenientes da polimerização incompleta das RAs. Este fato decorre de diferentes fatores, como a presença de infiltrado inflamatório e, em nível celular, de danos genéticos no DNA e estresse oxidativo. Além disso, a análise da morte celular induzida pelas próteses oculares pode ser realizada por meio da detecção de apoptose e necrose, além da avaliação de proteínas antiapoptóticas (como a proteína de sequência 1 de Leucemia de Células mieloides, Mcl-1) e proteases envolvidas na apoptose (como as caspases 3 e 9). Enquanto a Mcl-1 é uma proteína que atua no controle da apoptose, promovendo a sobrevivência celular, a ativação das caspases induz o desequilíbrio intracelular pelo aumento de espécies reativas de oxigênio.

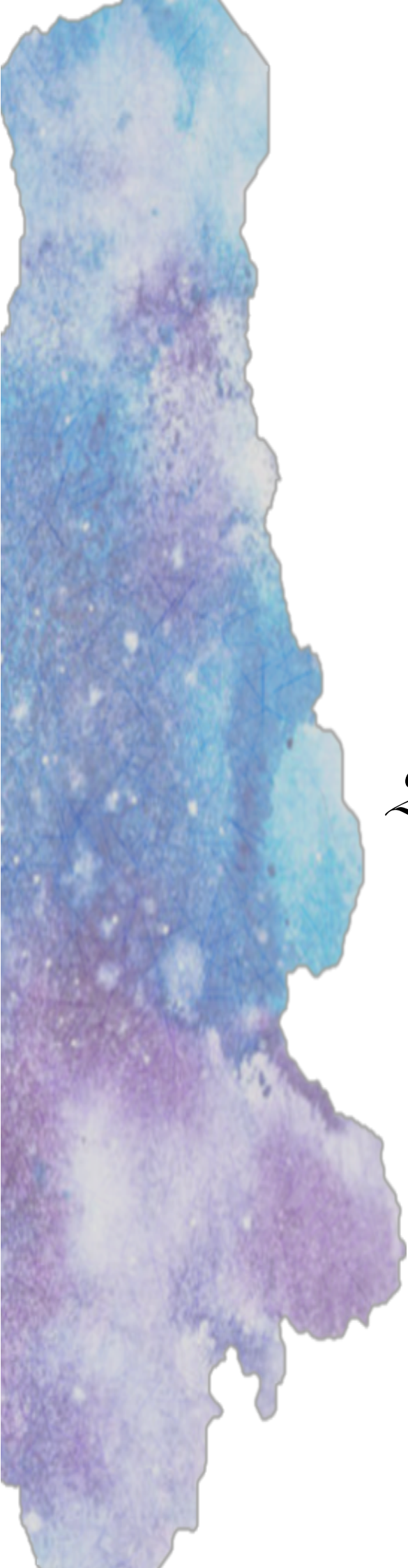
Além disso, é essencial avaliar o mecanismo de reparo tecidual, com o estudo da expressão gênica de proteínas que compõem a matriz extracelular (como o colágeno tipo IV - COL IV) e das enzimas (como a metaloproteinase de matriz 9 - MMP9) e fatores (como o fator de transformação do crescimento β - TGF β) que as regulam. O COL IV, produzido por células epiteliais, é essencial na composição da sua membrana basal. O

equilíbrio entre a sua síntese, estimulada pelo TGF β , e degradação, causada pela MMP9, é importante durante o processo de reparo tecidual, visando evitar uma reação fibrosa.

Os testes *in vivo* de toxicidade permitem o estudo dos mecanismos de reação adversa à um material. Por meio dos mesmos, é possível estudar as interações entre células e tecidos, simulando uma condição mais semelhante ao que ocorreria em humanos. Por meio do modelo de implantação no tecido subcutâneo de ratos, é possível analisar os efeitos locais de um determinado estímulo, possibilitando, por exemplo, a identificação de células inflamatórias e a análise da resposta tecidual local. Como estudos em humanos envolvem questões éticas para a sua realização e como os resultados obtidos em modelos animais possuem boa previsibilidade para a toxicidade em humanos (cerca de 70-80%), não sendo modelos mais resistentes do que em humanos, o presente estudo pode fornecer informações úteis para posteriormente ser testado em humanos.

Em uma revisão da literatura sobre a toxicidade da RA, foi observado que os artigos publicados sobre a toxicidade da RA de base de dentadura analisaram apenas se o material alterou ou não a proliferação celular, contudo o mecanismo pelo qual a toxicidade ocorre, a atividade quimiotóxica e a análise de apoptose ou necrose celular não foram previamente realizadas. Dessa forma, o presente estudo trará muitos benefícios para os profissionais e pacientes, pois permitirá identificar o(s) protocolo(s) mais biocompatível(is) para a confecção da prótese ocular.

Portanto, este estudo busca compreender, com maior clareza, os efeitos de diferentes ciclos e métodos de polimerização da RA branca de próteses oculares sobre a biocompatibilidade de células da conjuntiva humana e resposta inflamatória do tecido subcutâneo de ratos.



2. Capítulo I

Avaliação da resposta inflamatória do tecido subcutâneo de ratos à diferentes métodos de polimerização da resina acrílica branca de próteses oculares *

2.1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta tecidual de diferentes métodos de polimerização da resina acrílica (RA) branca no tecido subcutâneo de ratos Wistar, por meio da análise da resposta inflamatória. Foram confeccionados 60 corpos de prova em RA termopolimerizados em água aquecida (RNAA), por energia de microondas (RNTM) e quimicamente ativados (RNQA) (n=20/grupo). A resposta inflamatória foi analisada por meio do modelo de implantação de um corpo de prova de cada grupo no tecido subcutâneo de 20 ratos Wistar e avaliados 7, 15, 30 e 60 d após (n=20). Mastócitos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos foram contados no tecido adjacente ao corpo de prova após coloração com hematoxilina e eosina. A análise imunohistoquímica foi realizada para a detecção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17 e MIP-3 α . Os dados foram submetidos à Análise de Variância dois fatores e ao teste de Tukey com significância de 5%. Os resultados qualitativos foram comparados visualmente. Houve infiltrado inflamatório moderado para os grupos RNTM e RNQA e leve para o grupo RNAA após o período de 7 d. O infiltrado inflamatório e a imunomarcção dos alvos testados diminuiu gradativamente ao longo do período de 60 d. O grupo RNTM exibiu o maior número de células inflamatórias, com exceção do grupo RNAA, que apresentou maior número de eosinófilos e linfócitos no período de 15 d, e do grupo RNQA, onde foi observado maior número de macrófagos em 15 d e neutrófilos em 60 d. Os grupos RNAA e RNQA apresentaram maior imunomarcção de IL-1 β no período de 7 d. O grupo RNQA apresentou maior imunomarcção de IL-1 β (15 e 30 d), IL-6 (30 e 60 d), IL-17 (15 e 30 d) e TNF- α (7 d). Os grupos RNAA e RNTM apresentaram maior imunomarcção de TNF- α nos períodos de 15 e 30 d, enquanto o grupo RNTM, aos 60 d. Com base nos resultados, pode-

* Este artigo será formatado de acordo com as normas do periódico *Biomaterials*.

se concluir que os métodos de polimerização da resina por energia de microondas e por ativação química desencadearam uma resposta inflamatória mais intensa.

Palavras-chave: Olho artificial. Resinas acrílicas. Teste de materiais.

2.2 Introdução

O uso da prótese ocular para melhorar a autoestima dos indivíduos anoftálmicos, por meio do reestabelecimento da estética facial e manutenção da saúde das estruturas remanescentes, é um procedimento reabilitador viável e seguro.¹⁻³ Essa prótese, composta em maior volume por resina acrílica (RA) branca e em menor volume por resina incolor, pode ser polimerizada em água aquecida, por energia de microondas e ativada quimicamente.³⁻⁶

Dentre os fatores envolvidos no sucesso da reabilitação protética, é essencial que o material artificial utilizado possua a capacidade de não provocar efeitos indesejáveis, sejam locais ou sistêmicos, no indivíduo que o recebe.⁷ Porém, existem relatos na literatura de irritação associada ao uso de próteses oculares,^{8,9} que podem ocorrer quando há a conversão incompleta de monômeros de metacrilato de metila (MMA) em polímeros,^{4,10} com a liberação de substâncias potencialmente tóxicas, como formaldeído, ácido benzóico, ácido metacrílico, salicilato de fenila, dibutilftalato, benzoato de fenila e monômeros residuais de MMA.^{7,11-15}

Os testes *in vivo* de toxicidade permitem o estudo dos mecanismos de reação adversa à um material,¹⁶ por meio da análise de interações entre células e tecidos, simulando uma condição mais semelhante ao que ocorreria em humanos.¹⁷⁻¹⁹ O modelo de implantação no tecido subcutâneo de ratos permite analisar os efeitos locais de um determinado estímulo, possibilitando, por exemplo, a identificação de células inflamatórias e a análise da resposta tecidual local.^{20,21} Uma resposta inflamatória excessiva do organismo pode provocar danos irreversíveis,²² portanto é importante avaliar a capacidade das próteses oculares de induzir a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e conhecer o seu mecanismo de atividade

quimiotática.²² Esses mediadores secretados em condições de resposta inflamatória incluem o padrão de citocinas Th1, de atuação pró-inflamatória sendo os principais IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e Th2, de ação anti-inflamatória.²³

Visto que estudos em humanos envolvem questões éticas para a sua realização e como os resultados obtidos em modelos animais possuem boa previsibilidade para a toxicidade em humanos (cerca de 70-80%),¹⁹ não sendo modelos mais resistentes do que em humanos, o presente estudo pode fornecer informações úteis para pacientes e profissionais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta tecidual de diferentes métodos de polimerização da RA branca no tecido subcutâneo de ratos Wistar, por meio da análise da resposta inflamatória.

A hipótese nula testada é que os diferentes métodos de polimerização da RA branca não produzem efeitos de resposta tecidual inflamatória no tecido subcutâneo de ratos.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 *Confecção dos corpos de prova*

Foram confeccionados 60 corpos de prova em RA na cor branca (N1) (Artigos Odontológicos Clássico Ltda) e distribuídos em 3 grupos (n=20), de acordo com o método de polimerização: resina termopolimerizada em água aquecida (RNAA, Clássico, Artigos Odontológicos Clássico Ltda), resina polimerizada por energia de microondas (RNTM, Onda Ceryl, Artigos Odontológicos Clássico Ltda) e resina quimicamente ativada (RNQA, Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda) (Tabela 1).⁵

Os corpos de prova foram obtidos a partir de uma matriz metálica vazada contendo 10 compartimentos circulares com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura.^{2,5} A RA foi proporcionada, manipulada conforme recomendações do fabricante e inserida nos moldes das muflas. Para a polimerização, a contra-mufla foi posicionada sobre a mufla e o conjunto mantido a uma carga de 1.250 kgf em prensa hidráulica de bancada por 2 min.^{24,25} A

polimerização foi realizada conforme citado na Tabela 1 e, após esse período, os corpos de prova foram desincluídos e submetidos ao acabamento para a remoção dos excessos, com brocas abrasivas.⁵

2.3.2 Procedimento cirúrgico

Foram utilizados vinte ratos Wistar Albino, do sexo masculino, com idade de 4 meses. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e receberam água e alimentação *ad libitum*.^{20,21} Inicialmente, os corpos de prova foram esterilizados por exposição à luz ultra-violeta por 30 min por face.²⁶ Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de quetamina (25 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Então, foi realizada a tricotomia no dorso e assepsia da região dorsal com solução de Povidona-iodo (PVPI) 5%.^{20,21} Foi realizada uma incisão de 2 cm no sentido longitudinal em relação ao corpo do animal, com uma lâmina de bisturi nº 15 (Bard-Parker, Franklin Lakes). O tecido conjuntivo foi divulsionado lateralmente, com auxílio de uma tesoura de ponta romba, para a formação de três lojas cirúrgicas, correspondentes a cada grupo testado. Um corpo de prova de cada grupo foi implantado no espaço criado da loja cirúrgica correspondente, de forma que permanecessem distantes entre si, e a pele foi suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson).²⁷

2.3.3 Estudo histológico

Decorridos os períodos de 7, 15, 30 e 60 d após a implantação (n=5), foi realizada a eutanásia dos animais, com overdose de anestésico inalatório (Isoflurano, Cristália). Os corpos de prova e tecidos adjacentes foram removidos e fixados em formol tamponado 10% pH 7,0. Para o processamento histológico, as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 100%-I, 100%-II, 100%-III). Posteriormente, o corpo de prova foi cuidadosamente removido do interior do tecido que, por sua vez, foi diafanizado em banhos de Xilol e, finalmente, infiltrado e incluído em parafina. Os espécimes foram seccionados em cortes de 3 µm e corados com hematoxilina e eosina (HE), para posterior estudo microscópico

da contagem de células.^{20,21} A resposta tecidual foi classificada em 0 (nenhuma ou poucas células inflamatórias e sem reação tecidual), 1 (menos de 25 células e reação leve), 2 (entre 25 e 125 células e reação moderada) e 3 (mais de 125 células e reação severa). Uma média do número de células para cada grupo foi obtida a partir da contagem de mastócitos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, contados em 10 áreas separadas (magnificação 40×) de uma lâmina por um avaliador único.^{20,21}

2.3.4 Reações imunohistoquímicas(IHQ)

Foram selecionadas 20 lâminas de cada grupo para realização de reações IHQ, onde foram utilizados anticorpos primários feitos em cabra, para a detecção de interleucinas (IL) 1 β , 6 e 17 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), e feitos em coelho, para a detecção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e proteína inflamatória de macrófago 3 α (MIP-3 α /CCL20) (Abcam) (n=5). Esses anticorpos foram selecionados devido à sua alta atuação em processos inflamatórios. Como anticorpo secundário, foi utilizado anticorpo biotilado anti-IgG de cabra gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology Inc.) e de coelho gerado em cabra (Abcam). As reações obtidas foram amplificadas com o complexo de avidina-biotina (ABC Kit) (Vector Vectastain Elite ABC Kit Standard) e a Diaminobenzidina (DAB) (DAKO) foi o cromógeno utilizado. Ao término das reações IHQ, as lâminas receberam a contra-coloração pela Hematoxilina de Harris por 5 seg e passaram pelas etapas de desidratação para a montagem das lâminas com meio de montagem (DPX, Sigma Aldrich). O controle negativo das reações foi executado utilizando-se o protocolo descrito anteriormente, na ausência do emprego dos anticorpos primários.^{28,29}

Foi realizado o registro fotográfico das lâminas (magnificação 20×, exceto para MIP-3 α onde foi utilizada magnificação 10×), com câmera Olympus XC50 (Olympus) acoplada ao microscópio Olympus BX53 (Olympus). Houve um padrão de imunomarcção difusa para IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α . Portanto, as imagens foram deconvoluídas por meio do programa Fiji Image J e analisadas em limiar de cor padrão por um avaliador único. Já a imunomarcção MIP-

3ª apresentou-se pontual, sendo realizada a contagem de células marcadas por campo. Um valor médio de imunomarcação foi obtido para cada alvo.

2.3.5 Análise estatística

O software SPSS 21.0 (IBM Incorporation) foi utilizado para a análise dos dados. A avaliação quantitativa do processo inflamatório (coloração HE) e análise IHQ foram submetidas à análise de variância (ANOVA) dois fatores (Grupo e Período) e ao teste de Tukey com significância de 5%. Os resultados qualitativos foram comparados visualmente.

2.4 Resultados

Para avaliar a resposta inflamatória gerada pelo implante subcutâneo nas diferentes condições experimentais, foram analisados cortes corados por HE. Durante a análise, pode-se verificar a presença de infiltrado inflamatório moderado após 7 d da implantação de corpos de prova referentes aos grupos RNTM e RNQA; e leve após o mesmo período de implantação de corpos de prova do grupo RNAA. Ao longo do tempo de análise essas características indicativas de resposta inflamatória foram diminuindo gradativamente. Não foi observado, em nenhum dos grupos propostos, presença de necrose no tecido adjacente e formação de granulomas (Figura 1). Esse resultado fica mais evidente quando se avalia a média de células que foram recrutadas para o foco do processo inflamatório. Nos primeiros 7 d, foi observado um número maior de células (mastócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos) em comparação aos demais períodos, com exceção dos macrófagos que estavam em maior quantidade no período referente a 30 d. O grupo RNTM exibiu o maior número de células inflamatórias (Figuras 2 a 6), com exceção do grupo RNAA, que apresentou maior número de eosinófilos (Figura 3) e linfócitos (Figura 4) no período de 15 d, e do grupo RNQA, onde foi observado maior número de macrófagos em 15 d (Figura 5) e neutrófilos em 60 d (Figura 6).

Por meio da análise de IHQ, foi identificada a imunomarcação de diferentes alvos

(Figuras 7 a 16). De forma geral, quando analisada a imunomarcação ao longo de todos os períodos, maior resposta foi verificada após 7 d de implantação dos corpos de prova. Porém, exceções foram verificadas para a imunomarcação de IL-1 β dos grupos RNTM (apenas numérica) e RNQA, onde a resposta foi maior aos 15 d de implantação (Figura 8); para o IL-6 do grupo RNQA, onde a resposta foi maior aos 30 d (Figura 10) e; para o MIP-3 α dos grupos RNAA e RNQA, onde a resposta foi maior aos 30 d (Figura 16). Porém, para todos os alvos houve diminuição da imunomarcação no período de 60 d, em relação aos períodos anteriores.

Após 7 d de implantação dos corpos de prova, pode se verificar que os grupos RNAA e RNQA apresentaram maior imunomarcação de IL-1 β , com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo RNTM. No entanto, pode-se verificar nas análises de 15 e 30 d, que maior marcação foi verificada para o grupo RNQA (Figura 8). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à imunomarcação de IL-6 após 7 d de implantação dos corpos de prova. Porém, o grupo RNQA apresentou maior imunomarcação após os períodos de 30 e 60 d, sendo diferente estatisticamente dos demais grupos. Apesar a marcação de IL-6 ter reduzido aos 60 d, este grupo ainda apresentou uma quantificação estatisticamente igual ao período de 7 d (Figura 10). O grupo RNQA foi o que apresentou maior imunomarcação de IL-17, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos nos períodos de 15 e 30 d (Figura 12). Com relação ao TNF- α , o grupo RNQA exibiu maior imunomarcação após 7 d de implantação, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo RNTM. No entanto, nas análises de 15 e 30 d, a maior marcação foi verificada para os grupos RNAA e RNTM. Aos 60 d, o grupo RNTM exibiu maior imunomarcação que os demais grupos (Figura 14). Na análise da imunomarcação de MIP-3 α , não foi observada diferença estatisticamente entre os grupos nos diferentes períodos (Figura 16). Imagens representativas dos controles negativos da imunomarcação estão apresentados nas Figuras 17 e 18.

2.5 Discussão

A hipótese nula testada que os diferentes métodos de polimerização da RA branca não produzem efeitos de resposta tecidual inflamatória no tecido subcutâneo de ratos foi negada, visto que foram observadas diferenças entre os grupos, com relação ao número de células associadas à inflamação e à imunomarcagem dos mediadores inflamatórios avaliados.

Ensaio *in vivo* envolvem a complexidade da interação célula-célula e entre células e tecidos, além de envolver uma diversidade de tipos celulares e efeitos hormonais e sistêmicos,^{17-19,30} sendo essencial analisar a resposta tecidual local após a implantação da RA de prótese ocular no tecido subcutâneo de ratos. Considerando que a biocompatibilidade é diretamente dependente dos componentes liberados pela RA,³¹ foi observada a diminuição da resposta inflamatória ao longo do tempo. Mastócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos foram observados em maior quantidade nos primeiros 7 d após implantação dos corpos de prova, especialmente para o grupo RNTM (Figuras 1 a 4 e 6). Durante a polimerização por microondas, há o confinamento da resina no interior da mufla e o processo é realizado em ambiente seco, sendo dificultado o processo de lixiviação de monômeros residuais e outras substâncias.⁵ Além disso, a energia de microondas age somente sobre as moléculas de monômero.^{32,33} Esses fatores podem explicar os resultados encontrados. Corroborando com esses resultados, da Silva et al.⁵ verificaram resultados insatisfatórios *in vitro* da RNTM, que causou discreta citotoxicidade em linhagem de células da conjuntiva ocular.

Os mediadores secretados em condições de resposta inflamatória aguda incluem diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , estão presentes nas primeiras horas no sítio inflamatório, sendo responsáveis pela atividade quimiotática para diferentes células nos primeiros dias da inflamação,^{23,34} corroborando com os resultados do presente estudo. Os grupos RNAA e RNQA apresentaram maior imunomarcagem de IL-1 β no período

de 7 d (Figuras 7 e 8), enquanto o grupo RNQA apresentou maior imunomarcação de TNF- α no período de 7 d (Figuras 13 e 14). Esses mediadores são sintetizados por linfócitos, macrófagos, dentre outras células, e atuam de forma quimiotática atraindo células, como os linfócitos, para o sítio inflamatório.³⁴⁻³⁶ Os linfócitos, cuja função principal é produzir anticorpos (Linfócitos B) e induzir a resposta inflamatória (Linfócitos T),³⁴ foram as células mais recrutadas durante o processo, principalmente nos primeiros 7 d (Figura 4), seguido de mastócitos (Figura 2) e eosinófilos (Figura 3).

Neutrófilos e macrófagos foram encontrados em menor quantidade no período de 7 d (Figuras 1, 5, 6). A ausência de invasão importante de neutrófilos no tecido indica que não houve resposta inflamatória severa ou necrose associada ao implante subcutâneo, corroborando com Yokoyama et al.³⁷ Esses autores encontraram resultados semelhantes com a implantação de nanofibras de carbono no tecido subcutâneo, afirmando que a baixa quantidade de neutrófilos está associado à presença de um material não agudamente tóxico.³⁷ Já os macrófagos, foram observados em maior quantidade no período de 30 d (Figura 5). Possivelmente, os macrófagos foram "alternativamente" ativados (M2) a partir do estímulo que receberam, sendo atraídos para o local de implantação mais tardiamente.³⁸ Nessa condição, os macrófagos M2 promovem uma resposta imune do tipo Th2, induzindo o processo de reparo tecidual, angiogênese, remodelamento da matriz extracelular e atividade anti-inflamatória.^{38,39}

Porém, é interessante observar que o grupo RNQA apresentou maior imunomarcação de diferentes mediadores inflamatórios em períodos mais avançados de análise: IL-1 β (15 e 30 d) (Figuras 7 e 8), IL-6 (30 e 60 d) (Figuras 9 e 10), IL-17 (15 e 30 d) (Figuras 11 e 12). Esse fato pode ser explicado pelo baixo grau de conversão da resina acrílica durante a polimerização quimicamente ativada, resultando na liberação contínua de radicais livres e monômeros residuais não reagidos durante a polimerização.^{31,40} Estes são potencialmente irritantes ao tecido,⁴⁰ podendo ter influenciado na liberação contínua de mediadores pró-inflamatórios. A

IL-17 tem um importante papel na indução da inflamação tecidual local e a MIP-3 α , também conhecida por CCL20, é uma quimiocina inflamatória e, durante a inflamação, pode ser secretada ou expressa pelas células endoteliais, neutrófilos, células *natural killers*, linfócitos Th17, linfócitos B, e uma variedade de outras células do sistema imune relacionadas à resposta pró-inflamatória ou citotóxica.²⁶

Os grupos RNAA e RNTM apresentaram maior imunomarcção de TNF- α nos períodos de 15 e 30 d (Figuras 13 e 14). Esses achados corroboram com o estudo de Gretzer et al.,⁴¹ onde os autores observaram maior na quantidade de TNF- α no período de 21 d de análise. Os autores associam esse fator à uma resposta bifásica do TNF- α pois, além do aumento inicial da sua quantidade associado à implantação do corpo de prova, há um aumento desse mediador no estágio de reparo.⁴¹

No período de 60 d, houve diminuição da imunomarcção para todos os alvos da IHQ (Figuras 7 a 16). No entanto, é importante ressaltar que, neste período, os grupos RNQA e RNTM apresentaram imunomarcção estatisticamente maior de IL-6 (Figura 10) e TNF- α (Figura 14), respectivamente. Isso nos faz concluir que, apesar da resposta inflamatória ter diminuído, ela parece ter sido mais intensa nestes dois grupos.

Uma das limitações do estudo é que períodos de análise da resposta inflamatória menores que 7 d não foram incluídos. Porém, o intuito foi de evitar a interferência do fator procedimento cirúrgico em si nos resultados⁴¹ e para permitir que houvesse tecido adjacente ao corpo de prova suficiente para a análise.

2.6 Conclusão

De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que os diferentes métodos de polimerização da resina acrílica branca utilizada na confecção de próteses oculares resultaram em resposta inflamatória no tecido subcutâneo dos ratos. Os

métodos de polimerização dessa resina por meio de energia de microondas e por ativação química desencadearam uma resposta inflamatória mais intensa.

2.7 Referências

1. Fernandes AUR, Goiato MC, dos Santos DM. Effect of weathering and thickness on roughness of acrylic resin and ocular button. *Cont Lens Anterior Eye*. **33**, 124-7 (2010).
2. da Silva EVF, Goiato MC, Bonatto LDR, de Medeiros RA, Santos DMD, Rangel EC, et al.. Toxicity analysis of ocular prosthesis acrylic resin with or without pigment incorporation in human conjunctival cell line. *Toxicol Vitro*. **36**, 180-5 (2016).
3. Prithviraj DR, Gupta V, Muley N, Suresh P. Custom ocular prosthesis: Comparison of two different techniques. *J Prosthodont Res*. **57**, 129-34 (2013).
4. Canadas MD, Garcia LF, Consani S, Pires-de-Souza FC. Color stability, surface roughness, and surface porosity of acrylic resins for eye sclera polymerized by different heat sources. *J Prosthodont*. **19**, 52-7 (2010).
5. da Silva EV, Goiato MC, Dos Santos DM, Bonatto LD, Brito VG, de Oliveira SH. Effect of different methods of polymerizing ocular prosthesis acrylic resin on a human conjunctival cell line. *J Prosthet Dent*. **116**, 818-23 (2016).
6. Goiato MC, Bannwart LC, Haddad MF, dos Santos DM, Pesqueira AA, Miyahara GI. Fabrication techniques for ocular prostheses-An overview. *Orbit*. **33**, 229-33 (2014).
7. 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*. **91**, 905-9 (2009).
8. Pine K, Sloan B, Stewart J, Jacobs RJ. A survey of prosthetic eye wearers to investigate mucoid discharge. *Clin Ophthalmol*. **6**, 707-13 (2012).
9. Pine KR, Sloan BH, Jacobs RJ. A proposed model of the response of the anophthalmic

socket to prosthetic eye wear and its application to the management of mucoid discharge. *Med Hypotheses*. **81**, 300-5 (2013).

10. 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*. **19**, 306-12 (2011).

11. Chaves CA, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: A systematic review. *J Prosthet Dent*. **107**, 114-27 (2012).

12. Att W, Yamada M, Kojima N, Ogawa T. N-Acetyl cysteine prevents suppression of oral fibroblast function on poly(methylmethacrylate) resin. *Acta Biomater*. **5**, 391-8 (2009).

13. Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran)*. **9**, 180-8 (2012).

14. Tay LY, Herrera DR, Quishida CC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology*. **29**, e275-80 (2012).

15. Goiato MC, Freitas E, dos Santos D, de Medeiros R, Sonogo M. Acrylic resin cytotoxicity for denture base - Literature review. *Adv Clin Exp Med*. **24**, 679-86 (2015).

16. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: A review. *Clin Oral Investig*. **12**, 1-8 (2008).

17. Hartung T, Daston G. Are in vitro tests suitable for regulatory use? *Toxicol Sci*. **111**, 233-7 (2009).

18. Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A. Toxicity assessment of industrial chemicals and airborne contaminants: Transition from in vivo to in vitro test methods: a review. *Inhal Toxicol*. **17**, 775-87 (2005).

19. Ukelis U, Kramer PJ, Olejniczak K, Mueller SO. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status.

Regul Toxicol Pharmacol. **51**, 108-18 (2008).

20. Gomes-Filho JE, Gomes AC, Watanabe S, Oliveira SH, Bernabé PF, Percinoto C. Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus.

J Appl Oral Sci. **19**, 329-36 (2011).

21. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, et al. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod.* **36**, 1698-702 (2010).

22. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med.* **1**, 142-9 (2012).

23. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ.* **321**, 424 (2000).

24. Fernandes AU, Portugal A, Veloso LR, Goiato MC, Santos DM. Assessment of the flexural strength of two heat-curing acrylic resins for artificial eyes. *Braz Oral Res.* **23**, 263-7 (2008).

25. Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Iyda MG, Rezende MC, Haddad MC. Effect of disinfection and storage on the flexural strength of ocular prosthetic acrylic resins. *Gerodontology.* **29**, e838-44 (2012).

26. Zhao L, Mei S, Wang W, Chu PK, Wu Z, Zhang Y. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. *Biomaterials.* **31**, 2055-63 (2010).

27. Zaharia C, Zecheru T, Moreau MF, Pascaretti-Grizon F, Mabillean G, Marculescu B, et al. Chemical structure of methylmethacrylate-2-[2',3',5'-triiodobenzoyl]oxoethyl methacrylate copolymer, radio-opacity, in vitro and in vivo biocompatibility. *Acta Biomater.* **4**, 1762-9 (2008).

28. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig.* **19**, 2015-25 (2015).

29. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* **49**, 145-53 (2016).
30. Lin H, Bu Q, Zhao YL. Current methods and research progress in nanomaterials risk assessment. *Curr Drug Metab.* **13**, 354-63 (2012).
31. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater.* **23**, 363-8 (2007).
32. 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.* **17**, 340-4 (2004).
33. Compagnoni MA, Barbosa DB, de Souza RF, Pero AC. The effect of polymerization cycles on porosity of microwave-processed denture base resin. *J Prosthet Dent.* **91**, 281-5 (2004).
34. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. In: *Imunologia celular e molecular*. 2ª ed. Rio de Janeiro: *Revinter*. 253-76 (1998).
35. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol.* **147**, 227-35 (2007).
36. Nelson RT, Boyd J, Gladue RP, Paradis T, Thomas R, Cunningham AC, et al. Genomic organization of the CC chemokine mip-3alpha/CCL20/larc/exodus/SCYA20, showing gene structure, splice variants, and chromosome localization. *Genomics.* **73**, 28-37 (2001).
37. Yokoyama A, Sato Y, Nodasaka Y, Yamamoto S, Kawasaki T, Shindoh M, et al. Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats. *Nano Lett.* **5**, 157-61 (2005).

38. de Carli ML, Miyazawa M, Nonogaki S, Shirata NK, Oliveira DT, Pereira AA, et al. M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. *J Oral Pathol Med.* **45**, 141-7 (2016).
39. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* **8**, 958-69 (2008).
40. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, de Almeida FG, et al. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dent Mater.* **25**, 662-71 (2009).
41. Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, Thomsen P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed.* **17**, 669-87 (2006).

Tabela 1. Material, composição química e ciclo de polimerização dos materiais utilizados.

MATERIAL COMPOSIÇÃO QUÍMICA		POLIMERIZAÇÃO
	<u>Polimerização em água aquecida:</u>	Imersão da mufla em água; aquecimento
	Monômero de metilmetacrilado, topanol	por 30 min; temperatura ambiente por 30 min; fervura a 100°C por 1 h
Resina	<u>Polimerização em microondas:</u>	Mufla no microondas com potências de
acrílica	Monômero de metilmetacrilado,	30% (320 W) (3 min), 0% (0 W) (4 min
Líquido	topanol e etilenoglicoldimetacrilato	) e 60% (720 W) (3 min)
	<u>Ativação química:</u> Monômero de metilmetacrilato, inibidor, dimetiltoluidina	Mufla aberta em panela de pressão com a quantidade necessária de água, 20 libras de ar comprimido e polimerização por 20 min
Resina	Polímero de metilmetacrilato,	
acrílica	dibutilftalato, acrilato de etila,	
Pó	pigmentos	

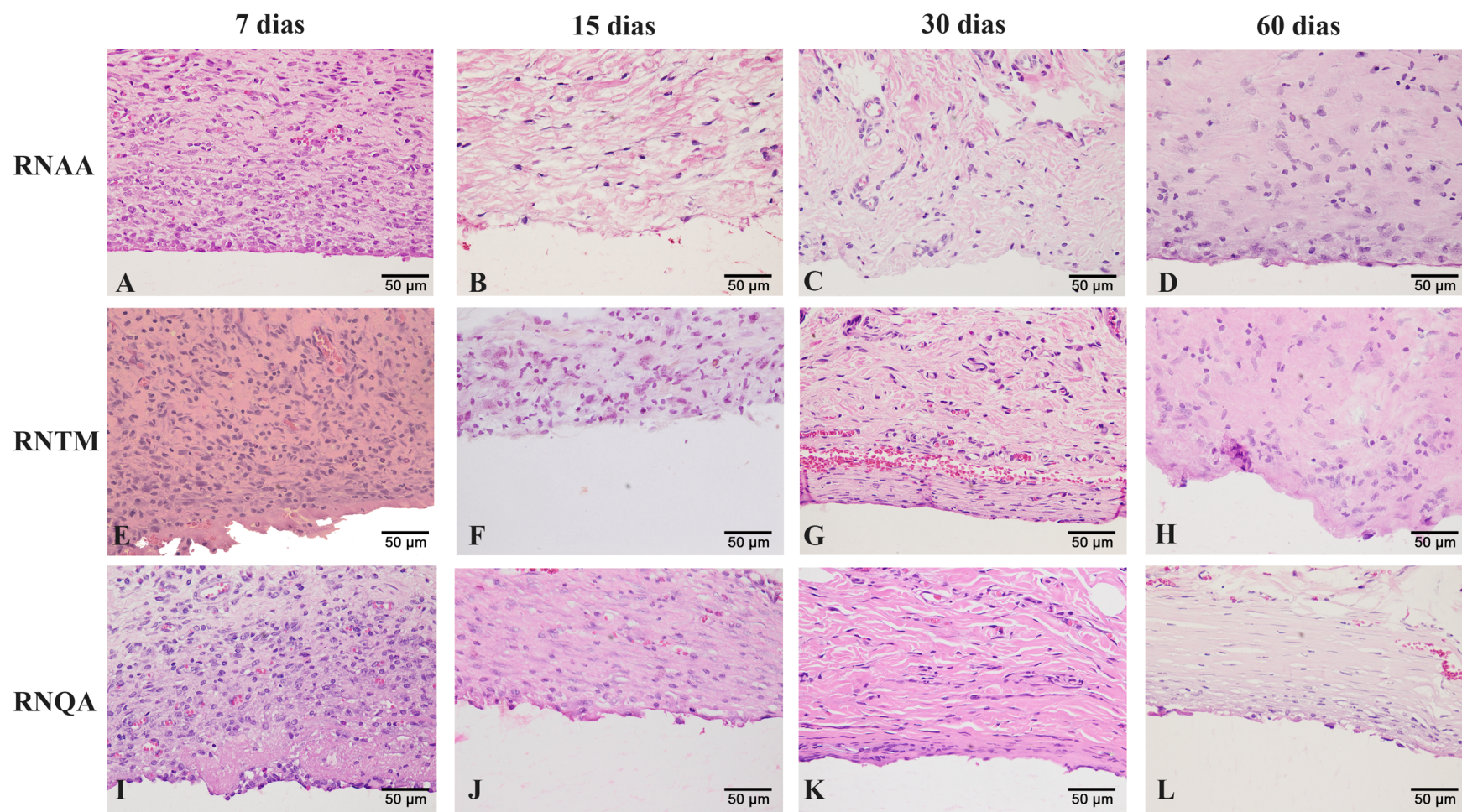


Figura 1. Imagem representativa do corte histológico do tecido subcutâneo de ratos corados por meio de coloração hematoxilina-eosina. Infiltrado inflamatório leve (A-D, F-H, J-L) e moderado (E, I) (magnificação 40×).

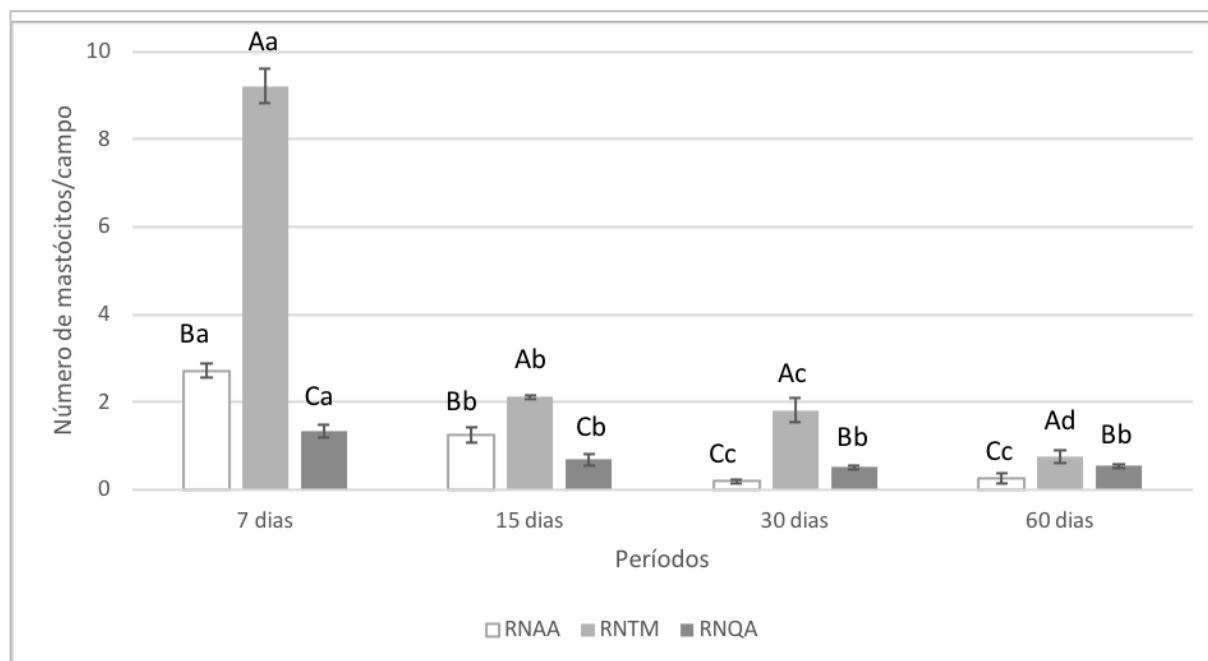


Figura 2. Número e desvio padrão de mastócitos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

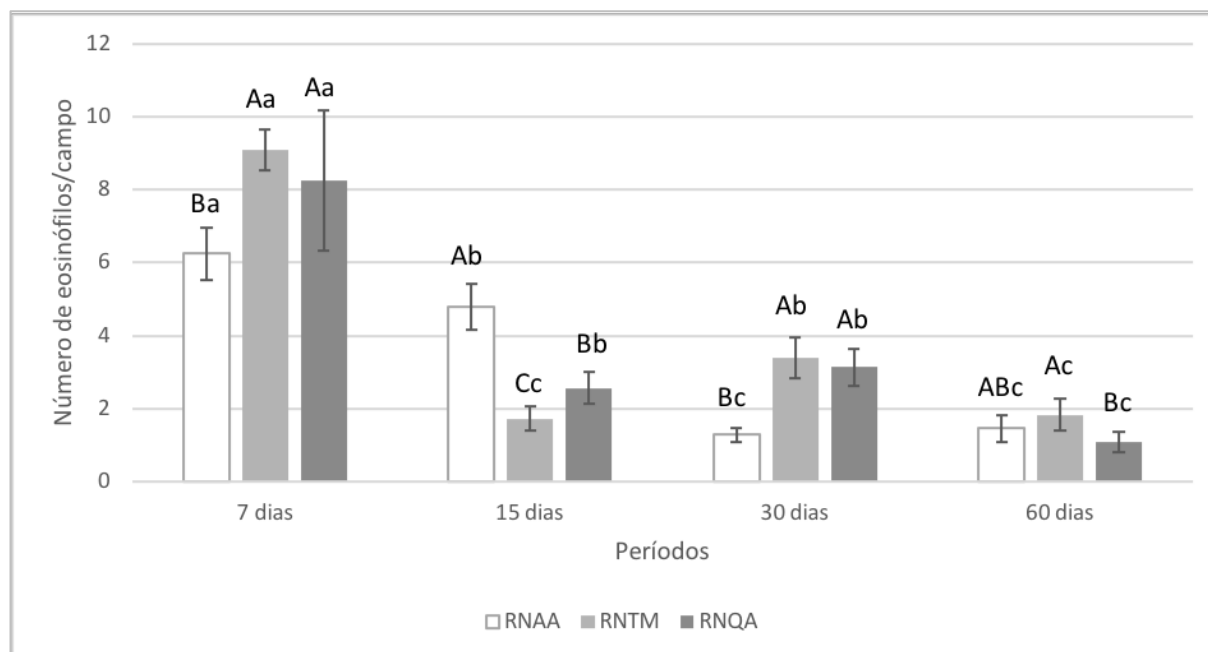


Figura 3. Número e desvio padrão de eosinófilos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

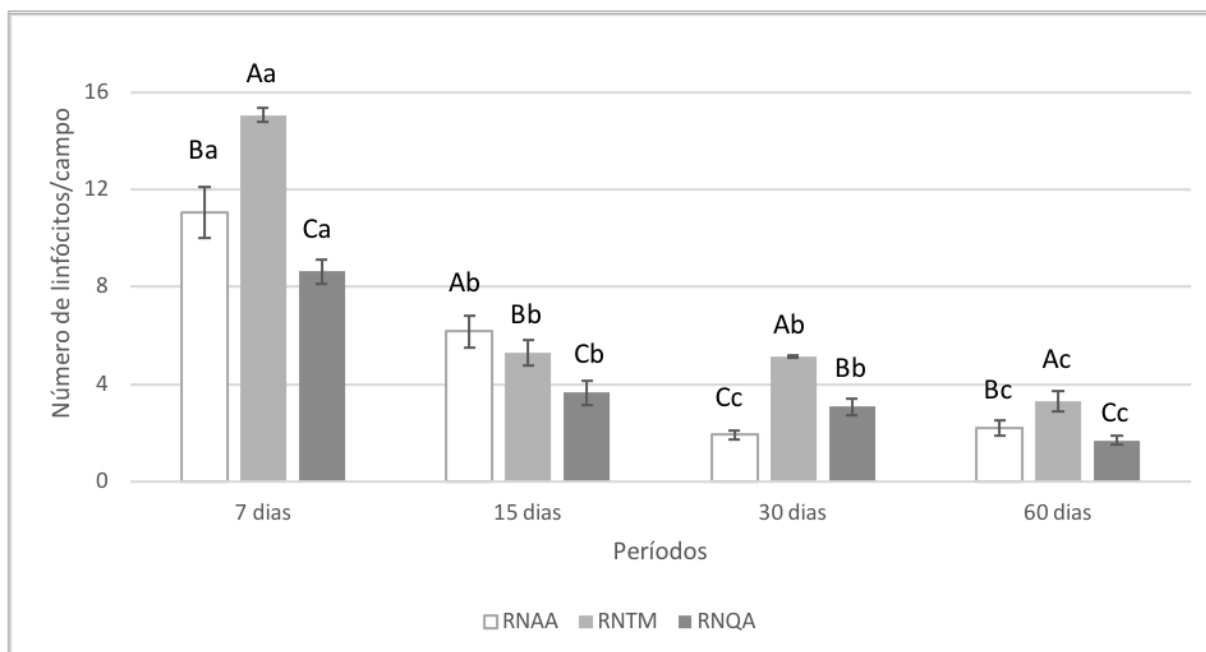


Figura 4. Número e desvio padrão de linfócitos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

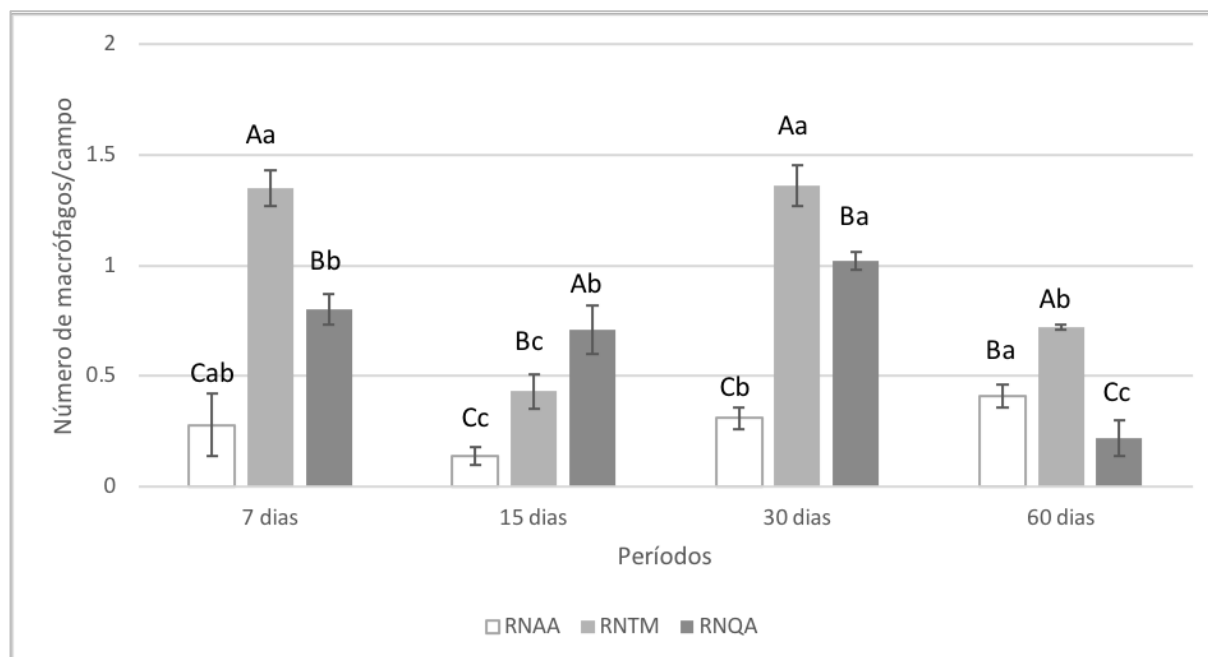


Figura 5. Número e desvio padrão de macrófagos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

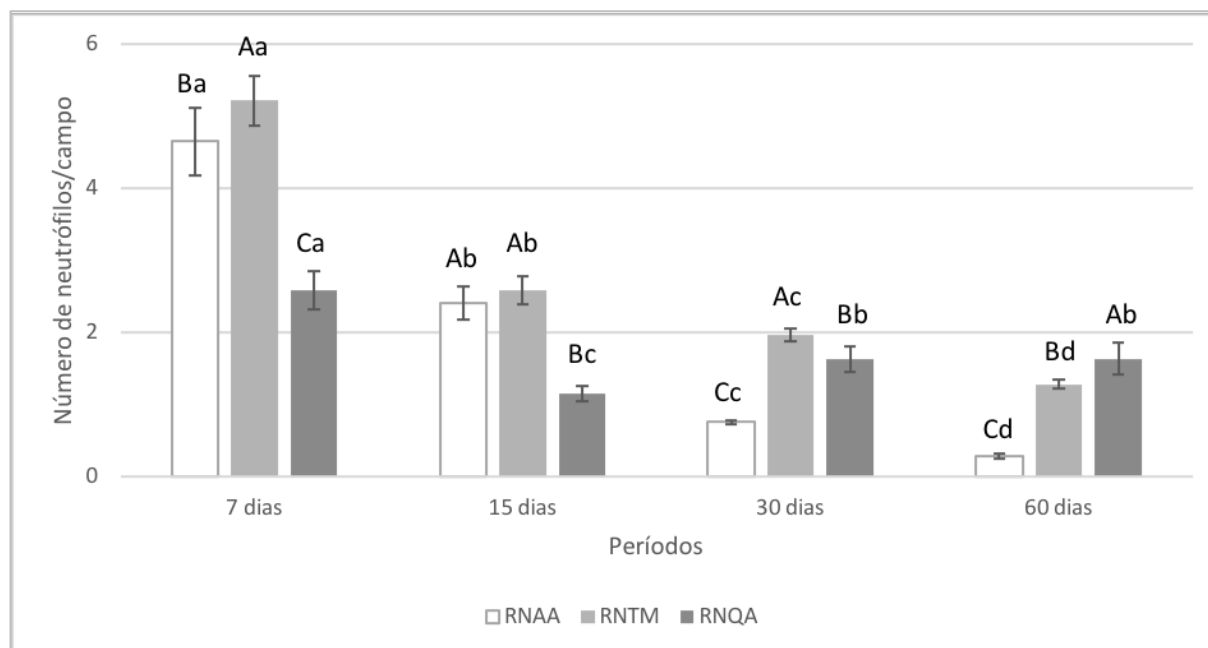


Figura 6. Número e desvio padrão de neutrófilos por campo para cada grupo proposto (RNAA, RNTM e RNQA) nos diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

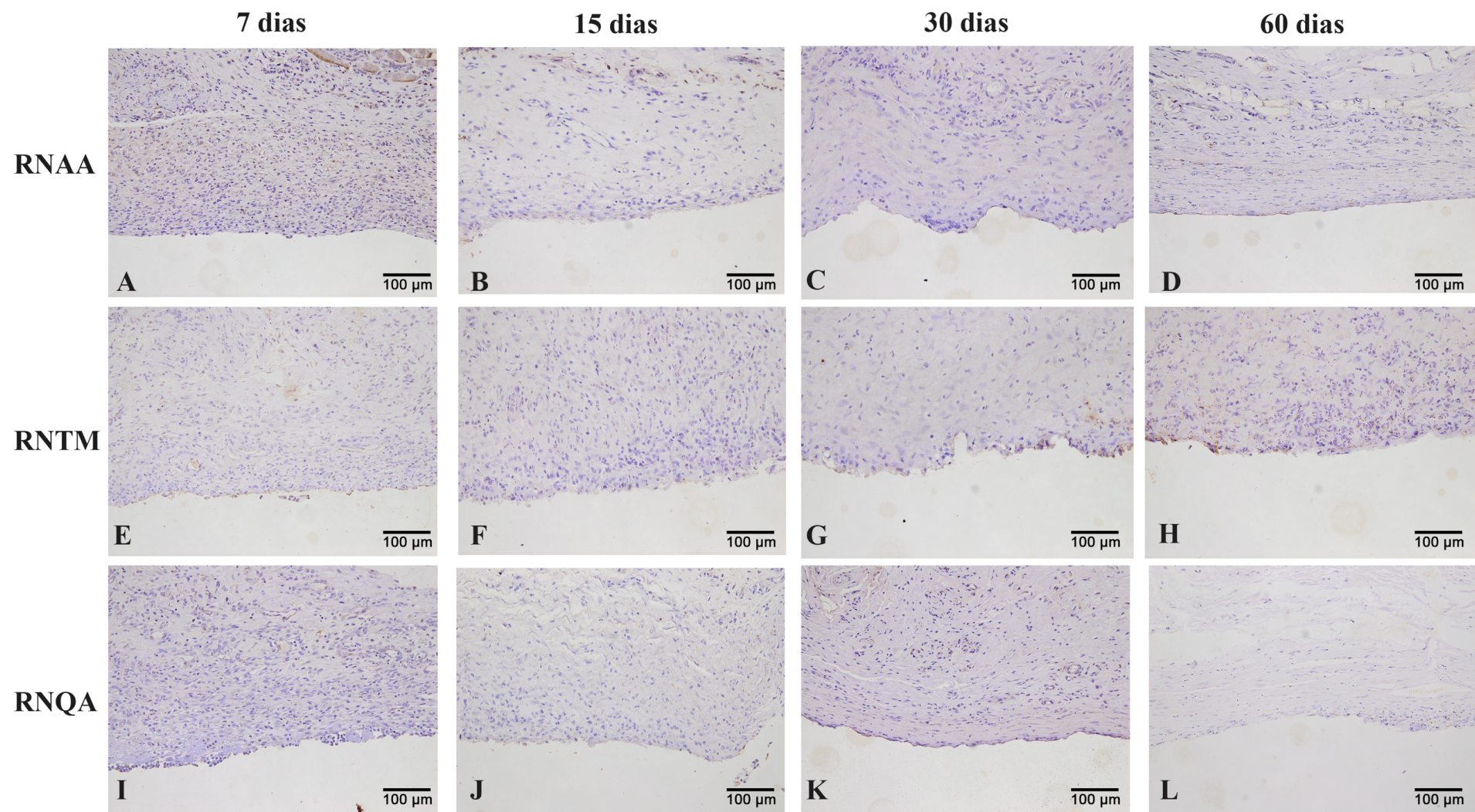


Figura 7. Imagem representativa da imunomarcção de IL-1 β nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20 $\times$).

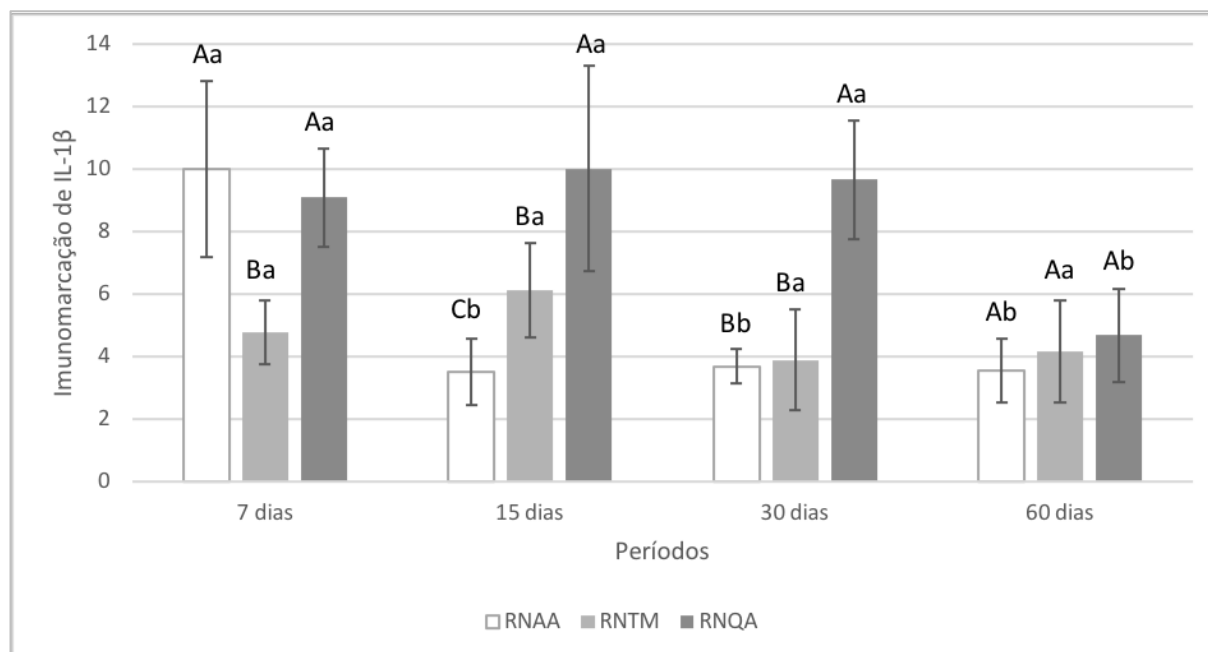


Figura 8. Análise imunohistoquímica para IL-1 β nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

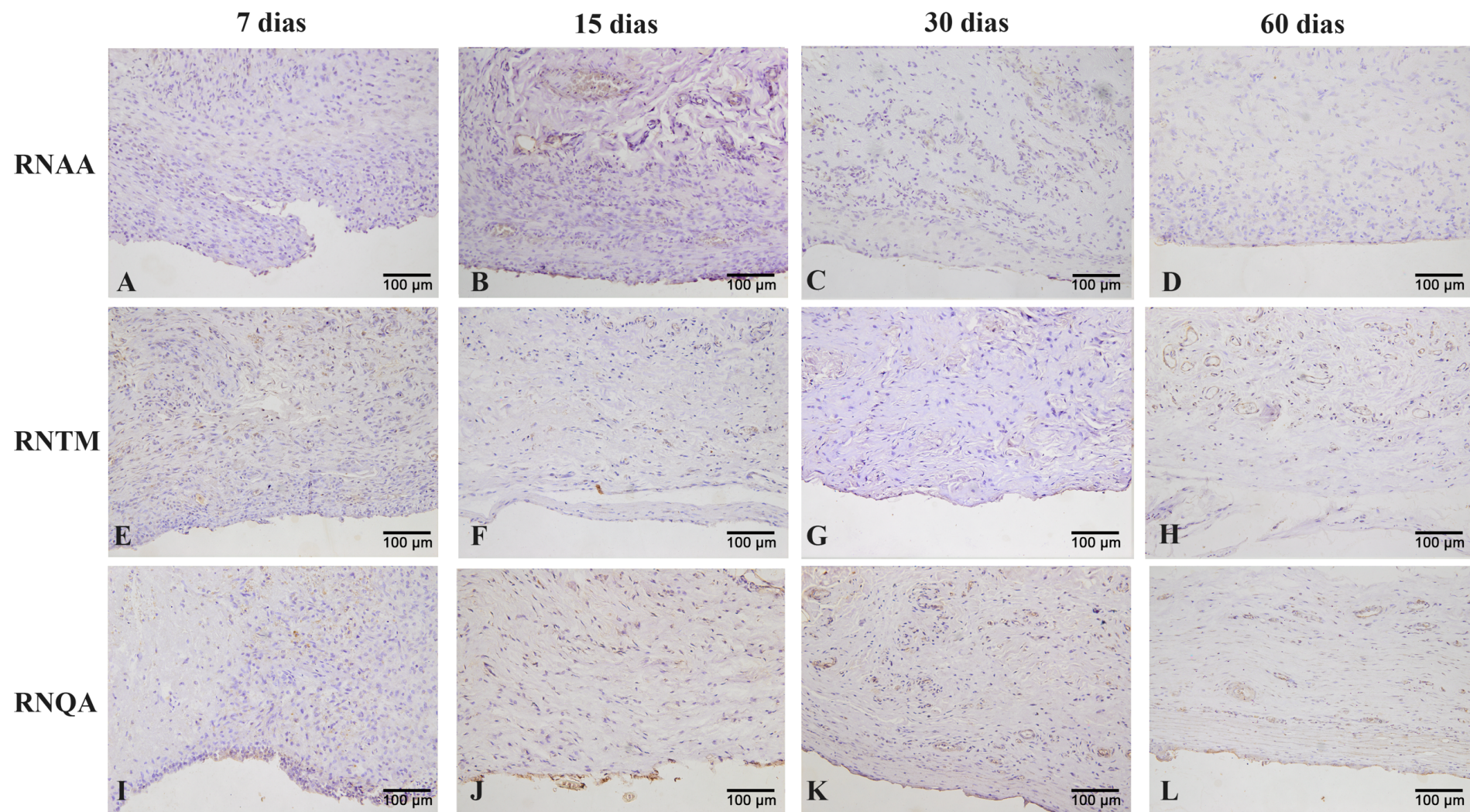


Figura 9. Imagem representativa da imunomarcção de IL-6 nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20×).

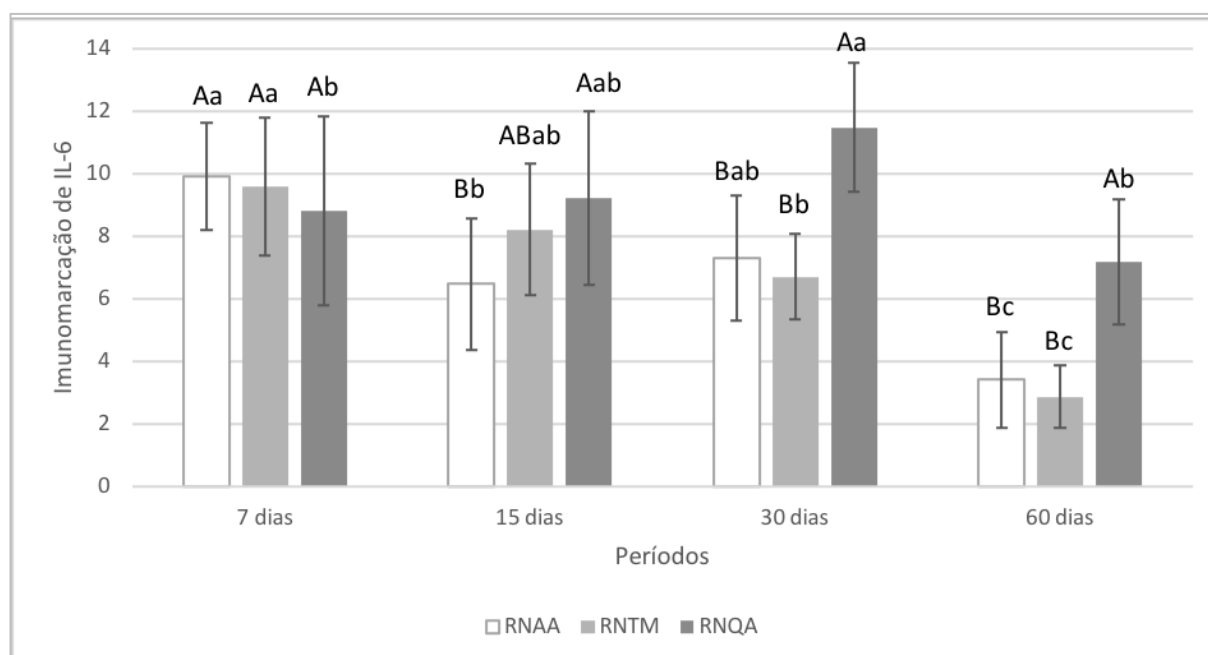


Figura 10. Análise imunohistoquímica para IL-6 nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

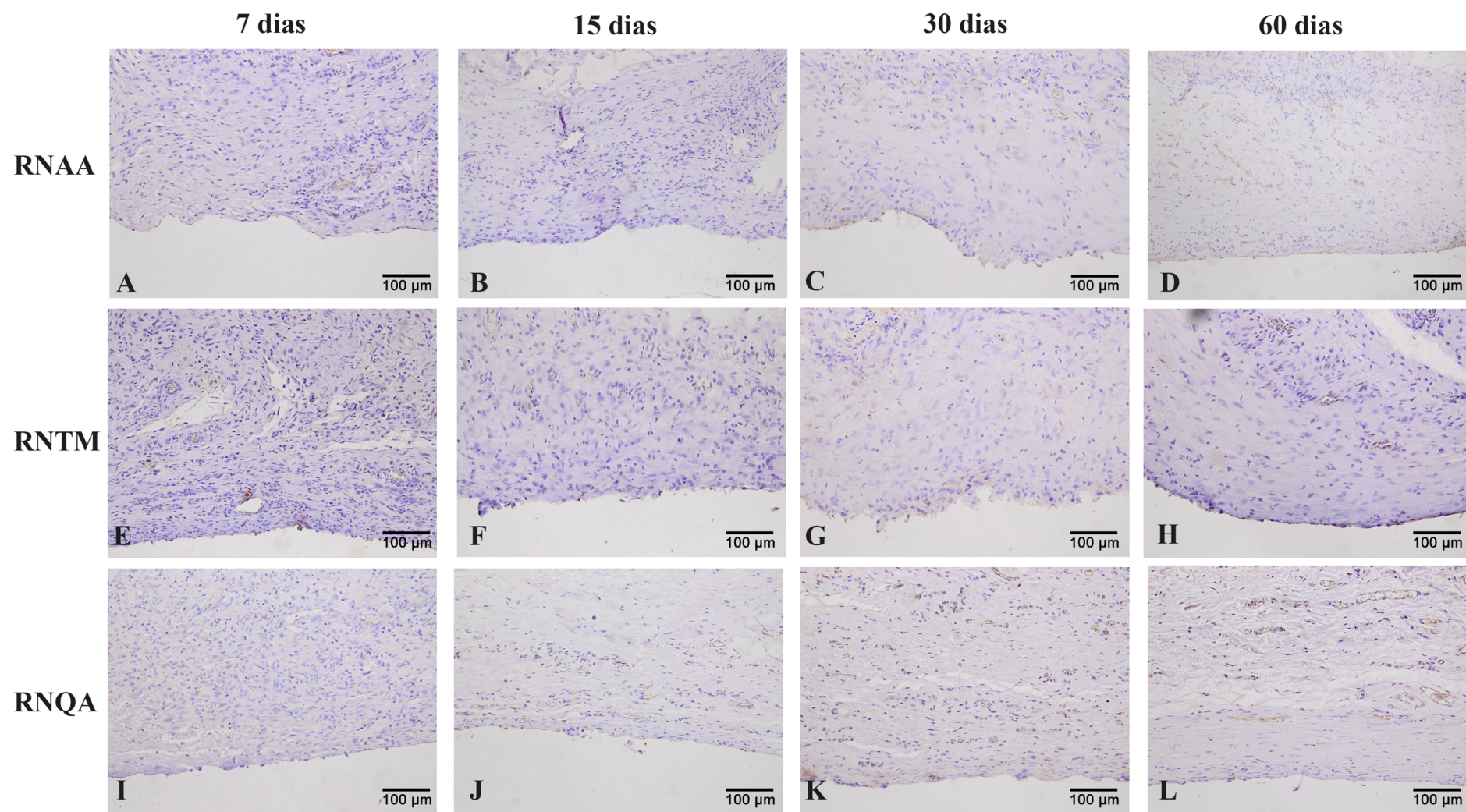


Figura 11. Imagem representativa da imunomarcação de IL-17 nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20×).

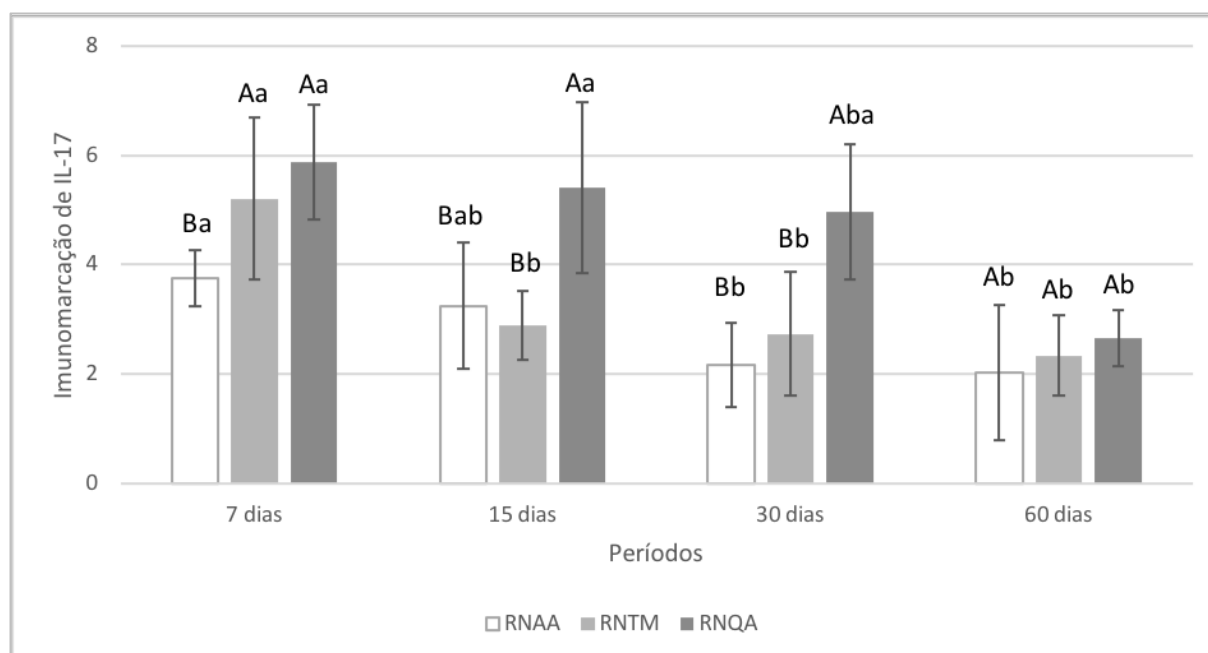


Figura 12. Análise imunohistoquímica para IL-17 nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).

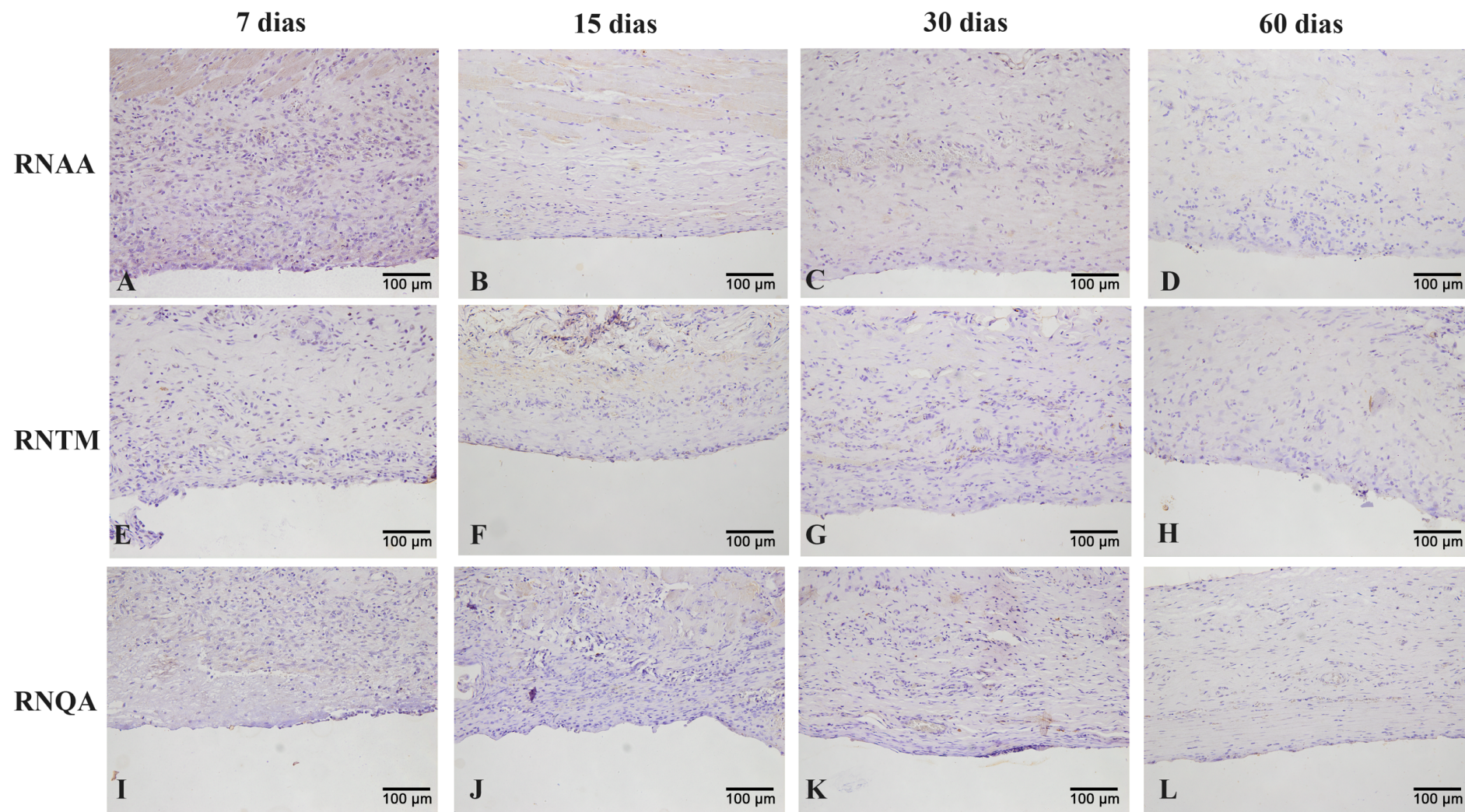


Figura 13. Imagem representativa da imunomarcação de TNF- α nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 20 $\times$).

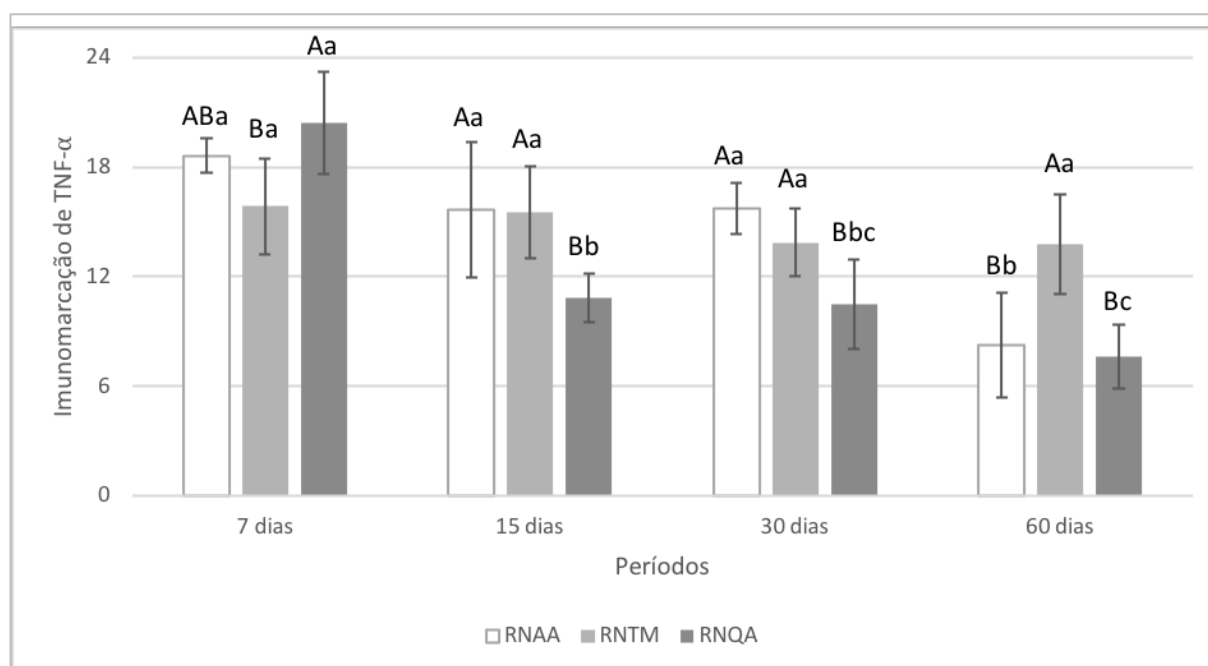


Figura 14. Análise imunohistoquímica para TNF- α nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p<0,05$).

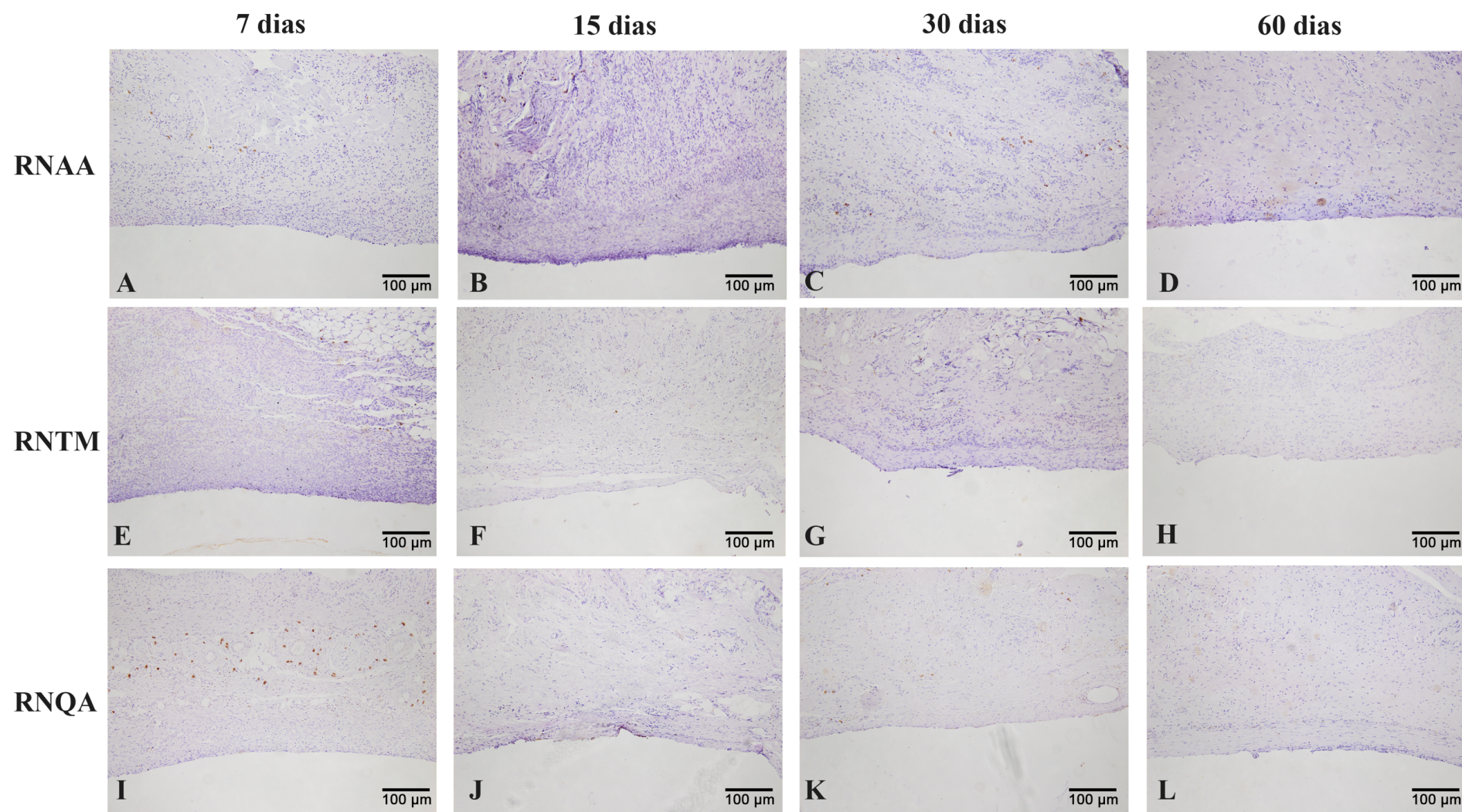


Figura 15. Imagem representativa da imunomarcagem de MIP-3 α nos grupos propostos em diferentes períodos (magnificação 10 $\times$).

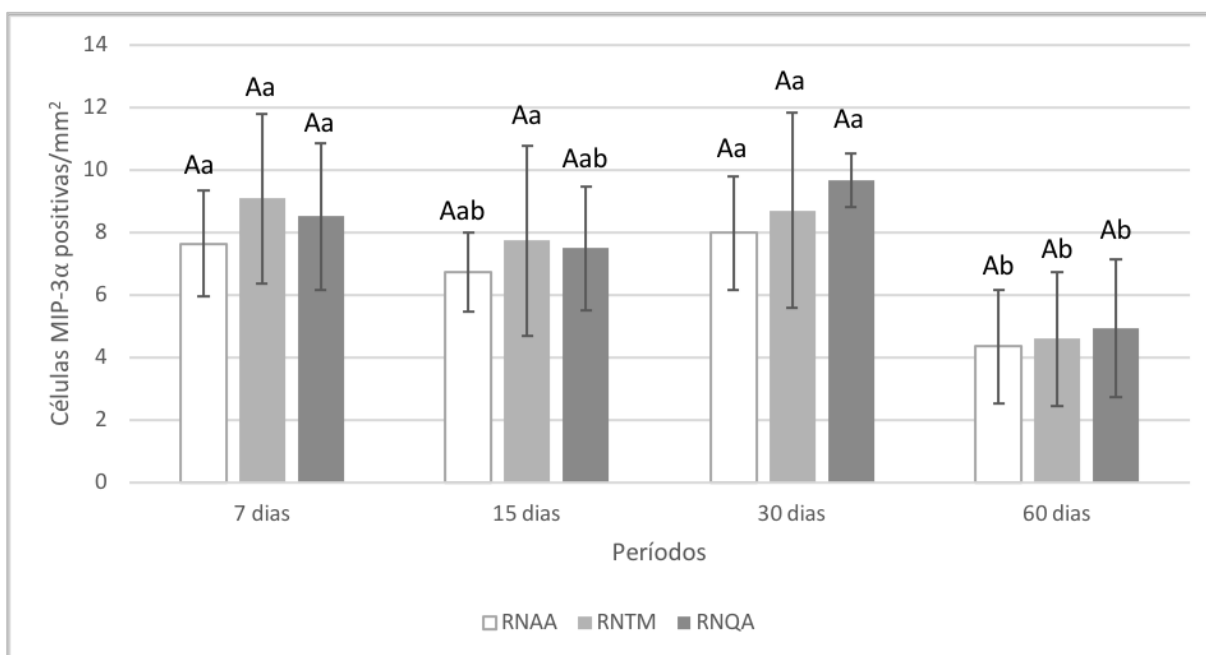


Figura 16. Análise imunohistoquímica para MIP-3 α nos grupos propostos em diferentes períodos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$).

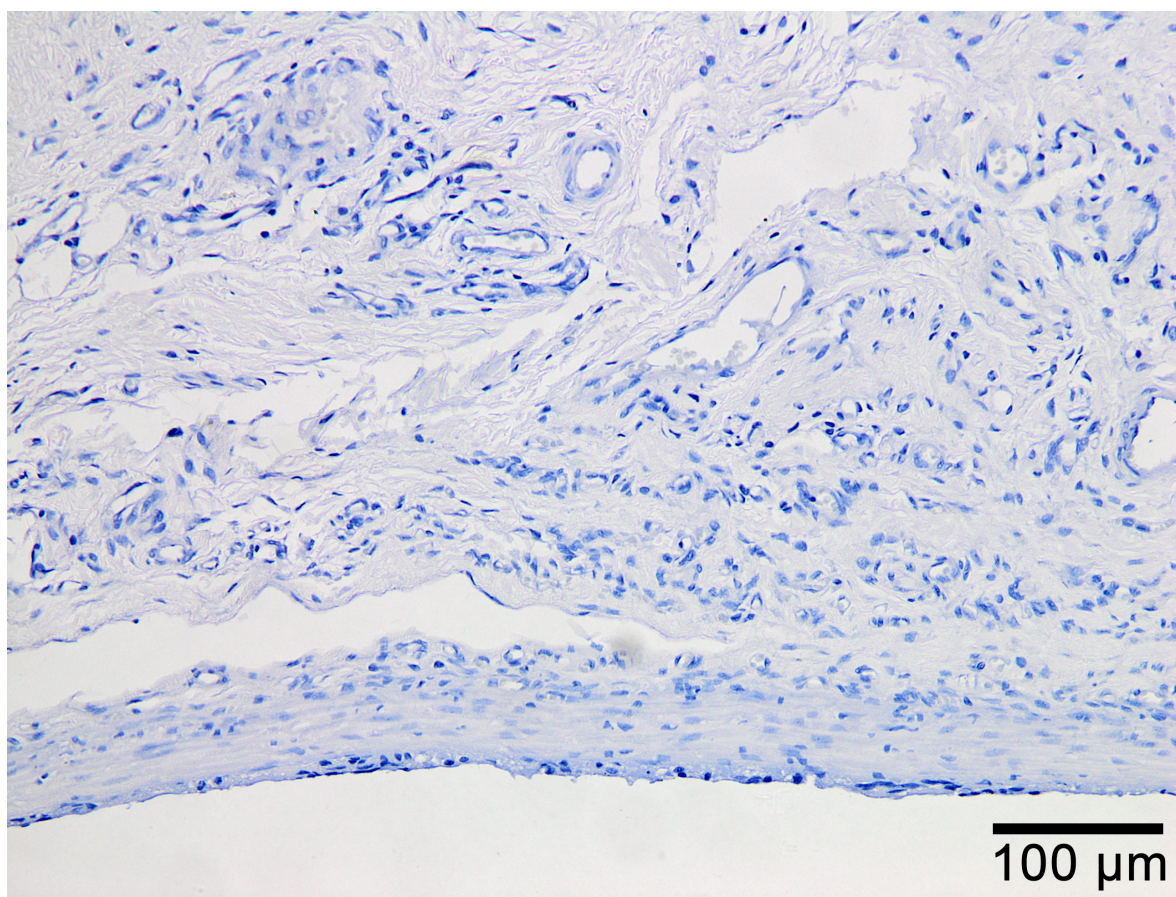


Figura 17. Imagem representativa do controle negativo da imunomarcção anti-cabra.

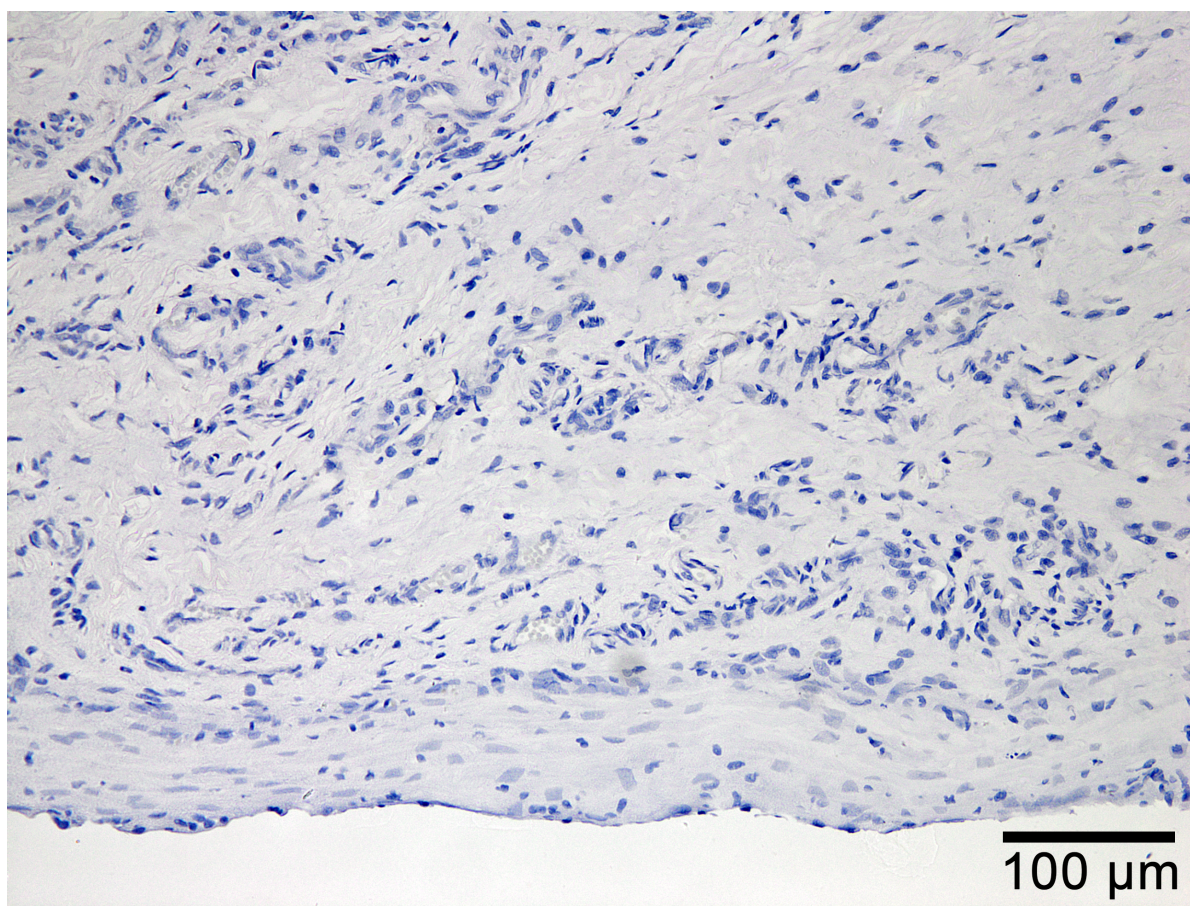


Figura 18. Imagem representativa do controle negativo da imunomarcção anti-coelho.



3. Capítulo II

Biocompatibilidade de diferentes métodos e ciclos de polimerização da resina acrílica branca: análise *in vitro* em células da conjuntiva humana*

3.1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes métodos e ciclos de polimerização da resina acrílica (RA) branca sobre a biocompatibilidade de células da conjuntiva humana. Onze grupos de resina foram confeccionados, sendo avaliados os métodos de polimerização em água aquecida, microondas ou ativação química, com diferentes ciclos de polimerização (n=8/grupo). O grau de conversão (GC) foi avaliado por meio da espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier. Após a formação dos extratos de RA por 72 h, a atividade citotóxica foi avaliada pelos ensaios de MTT e Alamar Blue após 24 h de exposição dos extratos às células Chang. A dosagem de diferentes mediadores inflamatórios foi analisada por meio do Ensaio imunoabsorbente de ligação enzimática. A expressão gênica de diferentes marcadores de reparo tecidual e de morte celular foi verificada por meio da técnica da Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real. A viabilidade e apoptose foi avaliada pela dupla marcação de Anexina V e iodeto de propídio. Os dados quantitativos foram submetidos à Análise de Variância e ao teste de Tukey com significância de 5% e, os qualitativos foram submetidos à estatística descritiva. Todos os grupos apresentaram proliferação celular maior que 75%. O ciclo longo de polimerização em microondas apresentou menor GC e percentual de proliferação celular no MTT e resultou em liberação de grandes quantidades de IL-2. No ensaio de Alamar Blue, esse grupo apresentou baixo percentual de proliferação celular, assim como o grupo que recebeu ciclo longo de polimerização em água aquecida e grupos submetidos à ativação química. Maior liberação de IL-6 foi observada nos grupos submetidos à ativação química e de IL-23 para o ciclo curto de polimerização em microondas. Maior expressão gênica de TGF β 1 ocorreu para o grupo que

* Este artigo será formatado de acordo com as normas do periódico *Biomaterials*.

recebeu ciclo longo de polimerização em água aquecida seguido de 30 min de armazenamento em água fervente. Maior expressão gênica de CASP9 ocorreu para o grupo ativado quimicamente sobre a bancada. Pode-se concluir que os métodos de polimerização por meio de energia de microondas (ciclo longo e curto) e por ativação química desencadearam uma resposta inflamatória mais intensa quanto à redução da proliferação de células da conjuntiva e liberação de mediadores inflamatórios. Dentre os métodos de polimerização recomendados pelo fabricante, a polimerização em água aquecida apresentou resultados mais satisfatórios.

Palavras-chave: Olho artificial. Resinas acrílicas. Citotoxicidade imunológica.

3.2 Introdução

A prótese ocular é utilizada para a reabilitação de indivíduos com anoftalmia com o intuito de reestabelecer a estética facial e, assim, otimizar a sua autoestima e relação social.¹⁻³ Para a sua confecção, geralmente são utilizadas resinas acrílicas (RA) nas cores branca e incolor, que podem ser polimerizadas de diversas maneiras. O método mais comum é a termopolimerização em água aquecida, porém podem ser utilizadas polimerização por energia de microondas e ativação química.^{1,4-6}

Por meio da mistura de um pó de polímero de metacrilato de metila (MMA) à um líquido de monômero de MMA, há a conversão de monômeros em polímeros durante a reação de polimerização, com a otimização de suas propriedades físicas.^{5,7} Porém, quando essa reação é incompleta, há um menor grau de conversão da RA, com a liberação de diversas substâncias potencialmente tóxicas e irritantes, como monômeros residuais de MMA.^{6,8-12}

Diferentes ciclos e métodos de polimerização da RA foram previamente avaliados, além do proposto pelo fabricante, quanto à sua influência nas características estéticas^{5,13,14} e mecânicas do material.^{5,15,16} Contudo, o comportamento biológico do material foi avaliado em RA de prótese total^{7,17,18} e ocular,¹⁹⁻²¹ porém sem comparação entre ciclos e métodos de polimerização.¹² Todavia, é essencial testar a biocompatibilidade da RA de prótese ocular,

diante da existência de relatos na literatura de irritação associada ao seu uso.^{22,23} Pine et al.²³ afirmam que a prótese ocular causa irritação física na cavidade anoftálmica e sugerem o material e o processo utilizados para a confecção da prótese como etiologia.

De acordo com Gautam et al.,²⁴ a irritação da mucosa oral é o efeito local mais severo associado à RA. Contudo, sabe-se que a mucosa mastigatória é queratinizada, o que está associado à maior resistência à substâncias tóxicas,²⁵ diferentemente da conjuntiva ocular, que não é queratinizada.²⁶ Portanto, o comportamento da exposição à RA é potencialmente mais tóxico nessas condições, sendo de suma importância entender como esse processo ocorre por meio da avaliação do comportamento celular na ausência da complexidade do organismo vivo;²⁷⁻²⁹ análise da produção de mediadores inflamatórios;^{30,31} estudo da morte celular induzida pelo materiais em nível celular, por meio de danos genéticos no DNA,⁶ e por meio da detecção de apoptose e necrose.^{6,32,33}

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes métodos e ciclos de polimerização da RA branca sobre a biocompatibilidade de células da conjuntiva ocular humana. Para isso, foi realizada a análise do grau de conversão (GC) da RA por meio da espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR); atividade citotóxica utilizando cultura de células Chang pelos ensaios de MTT e Alamar Blue; dosagem de diferentes mediadores inflamatórios por meio do Ensaio imunoabsorbente de ligação enzimática (ELISA); expressão gênica de diferentes alvos por meio da técnica da Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real e; marcação de células apoptóticas por Anexina V.

A primeira hipótese nula testada é que os diferentes métodos e ciclos de polimerização da RA branca não são capazes de interferir no GC do material. A segunda hipótese é que os mesmos métodos e ciclos não produzem efeitos de citotoxicidade, não sendo capaz de ativar células da conjuntiva humana.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 *Confecção dos corpos de prova*

Foram confeccionados corpos de prova em RA para prótese ocular na cor branca (N1) (Artigos Odontológicos Clássico Ltda),^{19,21} polimerizados por diferentes métodos e ciclos (n=8/grupo), conforme Tabela 1. Os corpos de prova foram distribuídos de acordo com o método de polimerização em resina termopolimerizada em água aquecida (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico Ltda) ou por energia de microondas (Onda Cryl, Artigos Odontológicos Clássico Ltda) e, resina quimicamente ativada (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda). Para cada grupo citado, o método de polimerização recomendado pelo fabricante, Polimerização 1, 6 e 9 (P1, P6 e P9), foi avaliado. Adicionalmente, diferentes ciclos de polimerização foram analisados, de acordo com: a temperatura e a duração da polimerização em água aquecida e o período de armazenamento final em água (polimerização em água aquecida - P2 a P5); a potência do microondas e duração da polimerização (polimerização em microondas - P7 e P8) e; o local de polimerização e período de armazenamento final em água (ativação química - P10 e P11).

Os corpos de prova foram confeccionados a partir de uma matriz metálica vazada contendo 10 compartimentos circulares com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura.^{19, 21,35-37} Em seguida, foi realizada a polimerização conforme citado na Tabela 1. Após esse período, os corpos de prova foram desincluídos e submetidos ao acabamento para a remoção dos excessos, com brocas abrasivas.¹⁹

3.3.2 *Análise grau de conversão por meio da espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR)*

O GC da resina foi identificado utilizando um espectrômetro de FT-IR (Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific) no modo de transmissão (n=5).^{38,39} Para análise inicial (monômero), foram registrados os espectros da resina por meio da análise de uma gota do material

imediatamente após a manipulação, depositado sobre o cristal do equipamento. Para a análise final, corpos de prova de todos os grupos foram posicionados sobre o mesmo cristal. A intensidade de absorbância do C=C (pico a 1640 cm⁻¹) do grupo metacrilato e do C=O (pico a 1735 cm⁻¹, utilizado como pico de referência antes e após a polimerização) do grupo éster foram utilizados para o cálculo do percentual de ligações duplas de carbono-carbono não reagidas. Os dados foram então inseridos na seguinte equação:^{40,41}

$$GC\% = [1 - \frac{(\text{Absorbância final } 1640 \text{ cm}^{-1} / \text{Absorbância final } 1735 \text{ cm}^{-1})}{(\text{Absorbância monômero } 1640 \text{ cm}^{-1} / \text{Absorbância monômero } 1735 \text{ cm}^{-1})}] \times 100\%$$

3.3.3 Obtenção dos extratos

Os extratos das substâncias hidrossolúveis presentes nos corpos de prova foram utilizados para a análise do efeito citotóxico das mesmas.^{42,43} Para isso, três corpos de prova de cada grupo foram colocados em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura 199 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubados em estufa à 37°C pelo período de 72 h, para permitir a difusão das substâncias para o meio de cultura, com a consequente formação dos extratos. Posteriormente, os extratos foram filtrados (filtros Millex 0,22 µm, Merck Millipore Corporation), tendo em vista a grande facilidade de contaminação do meio devido a sua riqueza em nutrientes.¹⁹

3.3.4 Cultura e Manutenção das Células

A linhagem de células epiteliais da conjuntiva humana (Wong Kilbourne derivada da conjuntiva Chang, clone 1-5c- 4), obtida da American Type Culture Collection (CCL-20.2), foi utilizada para avaliar o possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos materiais testados. As células foram expandidas em garrafas com meio de cultura 199 suplementado com 10% de SFB, 10 µg/mL de estreptomicina, 10 µg/mL de penicilina, 10 µg/mL de gentamicina e 250 µg/mL de fungizone, e incubadas com 5% de CO₂, em ambiente com umidade controlada à temperatura de 37°C.^{19,21}

3.3.5 Testes de citotoxicidade

Para a realização dos testes de citotoxicidade, foram preparadas suspensões de 5×10^4 células por poço, de uma placa de 24 poços. Após o período de 24 h de incubação com 5% de CO₂, em ambiente com umidade controlada à temperatura de 37°C, foi realizado o descarte do meio de cultura e 500 µL de extratos dos diferentes grupos foram adicionados em cada um dos poços (n=3).¹⁹ O grupo não estimulado (controle negativo) consistiu em poços sem tratamento, que receberam apenas o meio 199 com 10% de SFB.^{8,44} Já nos poços controle positivo, foram adicionados Tween 20 (Sigma-Aldrich). Após 24 h de incubação dos extratos com as células, a citotoxicidade foi avaliada por meio das análises de MTT e Alamar Blue.

O ensaio colorimétrico que utiliza um sal de tetrazólio (MTT) foi realizado para a análise da citotoxicidade visto que possibilita uma avaliação indireta da proliferação celular por meio da atividade enzimática mitocondrial das células viáveis.^{45,46} Os meios de cultura foram retirados e substituídos por 500 µL de meio 199 sem a adição de SFB contendo 0,5 mg/mL de MTT (3-[4,5-dimetilazol-2-il]- 2,5-difenil-tetrazolio), e incubados com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C por 4 h. Após a incubação, os meios de cultura foram removidos e o formazan intracelular foi liberado pela solubilização com 1 mL de álcool etílico 100%. As placas foram agitadas por 5 min, antes da mensuração das absorbâncias das amostras a 570 nm em espectrofotômetro UV-Visível. (SpectraMax 190, Molecular Devices).^{18,45,46}

O ensaio de Alamar Blue (sal de resazurina) é um indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade redox. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável).⁴⁷ Para a análise do Alamar Blue (Invitrogen, Life Technologies), os meios de cultura foram removidos e o reagente Alamar Blue foi adicionado aos poços na proporção 1:10 de meio de cultura sem a adição de SFB. As placas foram incubadas por 2 h a 37°C. Em seguida, 200 µL de cada poço foram transferidos para cada poço

da placa de 96 poços para a mensuração das absorbâncias das amostras a 570 nm e 600 nm em espectrofotômetro.⁴⁷

3.3.6 Determinação de níveis de citocinas e quimiocinas quantificados por um kit multiplex

O sobrenadante das culturas livres de células foi coletado após 24 h de contato dos extratos com as culturas celulares para a dosagem diferentes mediadores inflamatórios (n=3). Foi utilizado um kit multiplex específico para humanos (HTH17MAG-14K, Milliplex, Merck Millipore Corporation) para a realização do Ensaio imunoabsorbente de ligação enzimática (ELISA), conforme recomendações do fabricante.⁴⁸⁻⁵⁰ Foram avaliados os seguintes mediadores: fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interferon γ (IFN- γ), interleucinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17F, IL-17E/IL-25, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33), proteína inflamatória de macrófago 3 α (MIP-3 α /CCL20), fator de necrose tumoral α e β (TNF α e TNF β). Para isso, foi utilizado um aparelho Bio-plex 200 system (BioRad Laboratories) e os dados foram analisados por meio do software Analyst (Merck Millipore Corporation).¹⁹

3.3.7 Reação de transcriptase reversa seguida de reação de polimerase em cadeia (RT-PCR)

A reação RT-PCR em tempo real foi realizada para a análise quantitativa da expressão dos genes para os marcadores envolvidos no mecanismo de reparo tecidual, 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)¹⁹ e, para os marcadores relacionados à apoptose e morte celular, proteína de sequência 1 de Leucemia de Células mieloides (Mcl-1) (MCL1: Hs01050896_m1), caspases 3 (CASP3: Hs00234387_m1) e 9 (CASP9: Hs00609647_m1).

O reagente TRIzol (Ambion, Life Technologies) foi utilizado para a extração de RNA total das células após 24 h de contato dos extratos com as células (n=3), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi mensurada por espectrofotometria. As primeiras cadeias de cDNA foram sintetizadas com a utilização de 1 μ g de RNA total e

Superscript II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). Em seguida, procedeu-se a amplificação dos níveis de RNAm para COL IV, MMP9, TGF β , Mcl-1 e caspases 3 e 9, por meio de um aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies) e a sua mensuração. A detecção de RNAm para β -actina (ACTB: Hs03023880_g1) foi utilizada como controle endógeno. As reações foram realizadas utilizando um volume de 20 μ L, em duplicata para cada amostra, sendo seguidas as condições de ciclos térmicos recomendadas pelo fabricante. Os resultados foram posteriormente analisados utilizando o método de CT (Cycle Threshold) comparativo.^{6,19,48}

3.3.8 *Análise da morte celular pelo ensaio de Anexina V*

A viabilidade e apoptose de células da conjuntiva humana expostas à RA de prótese ocular foi avaliada pela dupla marcação de Anexina V e iodeto de propídio (Anexina V/PI).^{32,33} Foram preparadas suspensões de 1×10^5 células por poço de uma placa de 6 poços. Após o período de 24 h de incubação com 5% de CO₂, em ambiente com umidade controlada à temperatura de 37°C, foi realizado o descarte do meio de cultura e 3mL de extratos dos diferentes grupos foram adicionados em cada um dos poços (n=3). Após a exposição das células aos extratos de resina por 24 h, o kit Anexina V (Annevin V, Alexa Fluor 488, Life Technologies) foi utilizado, conforme recomendações do fabricante. A quantificação de fluorescência foi realizada utilizando o equipamento Countess II (Invitrogen, Life Technologies). Foi considerado o percentual de células da conjuntiva vivas (Anexina V negativo/PI negativo), em estágio de apoptose inicial (Anexina V positivo/PI negativo) e, em estágio de apoptose tardia/necrose (Anexina V positivo/PI positivo).⁵¹

3.3.9 *Análise estatística*

Foi utilizado o software SPSS 21.0 (IBM Incorporation) para a análise dos dados. Os dados obtidos nos ensaios de GC, MTT, Alamar Blue, ELISA e RT-PCR foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) um fator (Grupo) e ao teste de Tukey com significância de 5%.

Os resultados encontrados no ensaio de Anexina V foram submetidos à estatística descritiva para análise da distribuição percentual de células vivas, em estágio de apoptose inicial ou tardia/necrose.

3.4 Resultados

Durante a análise do GC, é possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p < 0,001$). Maior percentual de GC foi observado para o grupo P3 (85,6%), enquanto menor percentual foi verificado para o grupo P8 (69,6%) (Figura 1).

Pode-se observar, durante a análise da proliferação celular, diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p < 0,001$). No ensaio de MTT verificou-se que o grupo P8 apresentou o menor percentual de proliferação celular (85,4%), com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estimulado (100%) (Figura 2). O mesmo fato foi observado no ensaio de Alamar Blue para os grupos P2 (89,4%), P8 (86,3%), P9 (87,1%), P10 (89,28%) e P11 (75,3%) (Figura 2).

Durante o ensaio de ELISA observou-se, para cada grupo analisado, a liberação de mediadores inflamatórios em diferentes concentrações (Tabela 2). Contudo, somente para as concentrações de IL-2, IL-6 e IL-23 foi constatado diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Com relação à concentração de TNF- β , não foram detectáveis níveis desses alvos.

O grupo P8 liberou grandes quantidades de IL-2 (39.297 ng/mL), apresentando valores estatisticamente diferentes em relação aos demais grupos. O mesmo ocorreu, mas em menor quantidade, para os grupos P5 (8.591 ng/mL) e P10 (9.969 ng/mL) (Figura 3). Em uma escala menor, os grupos P3 (218,4 pg/mL), P8 (247,1 pg/mL), P9 (319,5 pg/mL), P10 (318,7 pg/mL) e P11 (277,8 pg/mL) também liberaram quantidades maiores de IL-6, apresentando valores

estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (Figura 4). Maiores concentrações de IL-23 também foram verificadas para os grupos P1 (287,0 pg/mL) e P7 (534,2 pg/mL), apresentando diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos e, desses grupos com o grupo controle (Figura 5).

Durante a análise da expressão gênica dos marcadores envolvidos no mecanismo de reparo tecidual, quantificações relativas de RNAm dos alvos testados (COL4, MMP9 e TGF β 1) foram avaliadas nos diferentes grupos. Porém, somente foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao se analisar a expressão gênica de TGF β 1, sendo verificado maior resultado para o grupo P3 (1,39) (Figura 6).

Para os marcadores relacionados à apoptose e morte celular (Mcl-1, CASP3 e CASP9), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos somente para a expressão gênica de CASP9. Foi verificado que os grupos P4 (1,09), P8 (1,10) e P10 (1,21) foram os que mais expressaram esse alvo, porém sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 7).

A marcação com Anexina V/PI permitiu a distinção de células viáveis, que constituíram o maior percentual encontrado, igual ou acima de 70%; células em apoptose inicial, até 17% e; células em apoptose tardia/necrose, no máximo 13% (Figura 8).

3.5 Discussão

A hipótese nula testada que os diferentes métodos e ciclos de polimerização da RA branca não são capazes de interferir no GC do material foi negada, visto que foram observadas diferenças entre os grupos. A hipótese que os mesmos métodos e ciclos produziram efeitos tóxicos sobre a linhagem celular estudada foi negada pois, apesar da proliferação celular tanto na análise de MTT quanto na de Alamar Blue ter sido maior que 75%,⁴³ foram verificadas

diferenças entre os grupos, além de diferenças nas concentrações de IL-2, IL-6 e IL-23 e expressão gênica de TGF β 1 e CASP9.

Com relação à conversão de monômeros em polímeros, o grupo P3 (água aquecida a 74°C por 9 h seguida de pós-polimerização em água a 100°C por 30 min) apresentou maior percentual de GC, sem diferença estatística do grupo P4 (água aquecida a 74°C por 9 h seguida de pós polimerização em água a 100°C por 3 h) (Figura 1). Possivelmente, isso ocorreu devido ao aumento da mobilidade de moléculas de monômero quando em altas temperaturas, otimizando a polimerização.⁵² Já o grupo P8 (potências de 90 W por 13 min e 500 W por 90 seg) apresentou menor percentual de GC (Figura 1), além de menor percentual de proliferação celular em relação ao grupo não estimulado no ensaio de MTT (Figura 2). Apesar disso, os resultados encontrados foram superiores a 75%, sendo o material considerado não citotóxico de acordo com a norma ISO 10993-5,⁴³ relacionada à métodos *in vitro* para a análise da citotoxicidade. Acredita-se que o ciclo longo de polimerização utilizando energia de microondas pode ter causado uma degradação do material,⁵² influenciando nos resultados observados.

Resultados divergentes foram observados em diversos estudos ^{8,53,54} que identificaram que a ativação química da RA de prótese total causa maior inibição da proliferação celular, quando comparada aos demais métodos de polimerização, devido ao menor grau de conversão alcançado e consequente maior quantidade de monômero residual liberado. Porém, resultados semelhantes foram encontrados por da Silva et al.¹⁹ que identificaram que a RA branca, que possui pó de menor granulação que a RA de prótese total, polimerizada em água aquecida ou ativada quimicamente, conforme as recomendações do fabricante, exibiu menor citotoxicidade que a resina polimerizada pela energia de microondas. Estes autores trazem a hipótese de que resultados menos satisfatórios podem ser encontrados para a polimerização por microondas devido à condição de confinamento da resina no interior da mufla durante a polimerização e resfriamento, fato que não ocorre na ativação química.¹⁹ Além disso, a atuação da energia de

microondas ocorre somente sobre as moléculas de monômero.^{55,56} No presente estudo, a polimerização por energia de microondas foi realizada em ambiente seco, sem a imersão da RA em água para permitir a lixiviação de monômeros residuais e outras substâncias. O grau de conversão atingido pode não ter sido suficiente para reduzir o potencial citotóxico do material.¹⁹

No método Alamar Blue foi possível verificar que um grupo da resina termopolimerizada por água aquecida (P2 - água aquecida a 74°C por 9 h), outro por energia de microondas (P8) e todos os grupos da resina polimerizada quimicamente (P9 - 20 min de polimerização sob 20 libras de ar comprimido; P10 - polimerização de bancada e; P11 - polimerização de bancada seguida de pós-polimerização em água a 60°C por 30 min) apresentaram percentual de proliferação celular menor que o grupo controle, com diferença estatisticamente significativa (Figura 2). Sabe-se que os monômeros residuais de MMA são os principais fatores associados às reações adversas causadas pela utilização de próteses totais, como a reação alérgica e irritação química local.⁹ Goiato et al.¹² compararam, por meio de uma revisão de literatura, a citotoxicidade de RAs de prótese total polimerizadas por diferentes métodos. Os autores observaram que a termopolimerização da resina permite a maior conversão de monômeros em polímeros, reduzindo a quantidade de monômero residual liberado, quando comparada à resina ativada quimicamente. Contudo, Vallitu et al.⁵⁷ verificaram que ciclos de polimerização com temperaturas inferiores a 100°C produzem resinas com maior quantidade de monômero residual.

Apesar de nenhum dos materiais testados terem sido tóxicos, pode-se observar a liberação de distintos mediadores químicos em diferentes concentrações (Tabela 2). O fenômeno da inflamação é mediado por essas substâncias químicas, cuja interação é complexa. Estas substâncias são oriundas do plasma, dos leucócitos, das plaquetas, do endotélio e do tecido conjuntivo. Porém, no presente estudo, somente as citocinas IL-2, IL-6 e IL-23 mereceram destaque, por apresentarem elevadas concentrações distintas para cada grupo estudado (Figuras 3 a 5). A IL-2 foi o mediador químico mais liberado pelas células Chang. O

grupo P8 foi o que mais liberou essa IL, seguido, em menor concentração, pelos grupos P10 e P5 (água aquecida a 74°C por 30 min seguida de pós-polimerização em água a 100°C por 30 min). Sabe-se que a IL-2 é uma glicoproteína envolvida na comunicação celular, sendo essencial na regulação da resposta imune. A partir de sua secreção, inicia-se uma ativação em cascata de diversas citocinas, incluindo outras interleucinas, interferons e fatores de necrose tumoral, com efeitos sinérgicos e inibitórios sobre a sua própria atividade no sistema imune.^{58,59}

Já a IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia em respostas imune antígeno específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação.^{60,61} A maior quantidade dessa interleucina foi encontrada nos grupos de resinas polimerizadas quimicamente (P9, P10 e P11), seguida por um grupo de resina polimerizada por energia de microondas (P8) e por outro polimerizada por água aquecida (P3). A IL-23 é uma citocina heterodimérica, que desempenha um papel nas respostas imunológicas inatas e adaptativas. É produzida por células dendríticas, macrófagos e várias outras células do sistema imunológico.⁶² A maior quantidade desta interleucina foi verificada para o grupo P7 (potência de 500 W por 3 min).

Com relação à quantificação relativa de RNAm para COL IV e MMP9, marcadores envolvidos no mecanismo de reparo tecidual, não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre grupos. Porém, pode-se observar maior expressão de TGF β 1 no grupo P3 (Figura 6). De acordo com Simon et al.,⁶³ o COL IV é produzido por células epiteliais, sendo a sua presença essencial para compor a membrana basal celular. A expressão de TGF β estimula a síntese de COL IV e a síntese de MMP9, atuando na degradação de COL IV.^{64,65} Segundo Yang et al.,⁶⁵ a produção exacerbada de metaloproteinase pode resultar em danos severos ao tecido, sendo essencial um equilíbrio entre a sua ativação e inibição. Sendo assim, é importante que exista equilíbrio na expressão de RNAm para estes alvos, visando a preservação da estrutura da célula Chang, célula epitelial utilizada no presente estudo.

A Mcl-1 é uma proteína que atua no controle da apoptose, promovendo a sobrevivência celular,⁶⁶ enquanto que a ativação das caspases induz o desequilíbrio intracelular pelo aumento de espécies reativas de oxigênio.⁶⁷ Para a quantificação relativa de RNAm para esses marcadores (Mcl-1, CASP3 e CASP9), pode-se observar um equilíbrio na sua expressão. Não foi encontrada uma expressão destes alvos por algum grupo que fosse maior estatisticamente que a do grupo controle (Figura 7), o que nos permite concluir que a linhagem de células Chang produz esses alvos em condições fisiológicas. Esses resultados estão de acordo com os obtidos pelo ensaio com Anexina V/PI. Por esse método foi possível verificar um percentual pequeno de células em apoptose inicial (até 17%) ou em apoptose tardia/necrose (até 13%) (Figura 8).

Novos estudos podem ser realizados em indivíduos usuários de prótese ocular para avaliar os diferentes métodos e ciclos de polimerização da RA, visando identificar métodos mais biocompatíveis e potencialmente menos irritantes, com o intuito de orientar o clínico durante a reabilitação.

3.6 Conclusão

De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que os métodos de polimerização por energia de microondas (ciclo longo e curto) e por ativação química desencadearam uma resposta inflamatória mais intensa quanto à redução da proliferação de células da conjuntiva e liberação de mediadores inflamatórios. Dentre os métodos de polimerização recomendados pelo fabricante, a polimerização em água aquecida apresentou resultados mais satisfatórios.

3.7 Referências

1. Prithviraj DR, Gupta V, Muley N, Suresh P. Custom ocular prosthesis: Comparison of two different techniques. *J Prosthodont Res.* **57**, 129-34 (2013).

2. Goiato MC, Santos DM, Souza JF, Moreno A, Pesqueira AA. Chromatic stability of acrylic resins of artificial eyes submitted to accelerated aging and polishing. *J Appl Oral Sci.* **18**, 641-5 (2010).
3. Fernandes AUR, Goiato MC, dos Santos DM. Effect of weathering and thickness on roughness of acrylic resin and ocular button. *Cont Lens Anterior Eye.* **33**, 124-7 (2010).
4. Goiato MC, Bannwart LC, Haddad MF, dos Santos DM, Pesqueira AA, Miyahara GI. Fabrication techniques for ocular prostheses-An overview. *Orbit.* **33**, 229-33 (2014).
5. Canadas MD, Garcia LF, Consani S, Pires-de-Souza FC. Color stability, surface roughness, and surface porosity of acrylic resins for eye sclera polymerized by different heat sources. *J Prosthodont.* **19**, 52-7 (2010).
6. Att W, Yamada M, Kojima N, Ogawa T. N-Acetyl cysteine prevents suppression of oral fibroblast function on poly(methylmethacrylate) resin. *Acta Biomater.* **5**, 391-8 (2009).
7. 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.* **19**, 306-12 (2011).
8. 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.* **91**, 905-9 (2009).
9. Chaves CA, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: A systematic review. *J Prosthet Dent.* **107**, 114-27 (2012).
10. Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran).* **9**, 180-8 (2012).
11. Tay LY, Herrera DR, Quishida CC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology.* **29**, e275-80 (2012).
12. Goiato MC, Freitas E, dos Santos D, de Medeiros R, Sonogo M. Acrylic resin

cytotoxicity for denture base - Literature review. *Adv Clin Exp Med.* **24**, 679-86 (2015).

13. Goiato MC, dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology.* **30**, 276-82 (2013).

14. Assunção WG, Barão VA, Pita MS, Goiato MC. Effect of polymerization methods and thermal cycling on color stability of acrylic resin denture teeth. *J Prosthet Dent.* **102**, 385-92 (2009).

15. Goiato MC, dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Dekon SF. Effect of thermal cycling and disinfection on microhardness of acrylic resin denture base. *J Med Eng Technol.* **37**, 203-7 (2013).

16. Barbosa DB, Monteiro DR, Barão VA, Pero AC, Compagnoni MA. Effect of monomer treatment and polymerisation methods on the bond strength of resin teeth to denture base material. *Gerodontology.* **26**, 225-31 (2009).

17. Bayraktar G, Guvener B, Bural C, Uresin Y. Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **76**, 340-5 (2006).

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.* **24**, 52-7 (2007).

19. da Silva EV, Goiato MC, Dos Santos DM, Bonatto LD, Brito VG, de Oliveira SH. Effect of different methods of polymerizing ocular prosthesis acrylic resin on a human conjunctival cell line. *J Prosthet Dent.* **116**, 818-23 (2016).

20. da Silva EVF, dos Santos DM, da Rocha Bonatto L, Balera Brito VG, de Oliveira SHP, Goiato MC. Influence of preparation and exposure periods of eluates from ocular prosthesis acrylic resin in human conjunctival cell line. *Iran Biomed J.* (2018) [in press].

21. da Silva EVF, Goiato MC, Bonatto LDR, de Medeiros RA, Santos DMD, Rangel EC,

- et al. Toxicity analysis of ocular prosthesis acrylic resin with or without pigment incorporation in human conjunctival cell line. *Toxicol Vitro*. **36**, 180-5 (2016).
22. Pine KR, Sloan BH, Jacobs RJ. A proposed model of the response of the anophthalmic socket to prosthetic eye wear and its application to the management of mucoid discharge. *Med Hypotheses*. **81**, 300-5 (2013).
23. Pine K, Sloan B, Stewart J, Jacobs RJ. A survey of prosthetic eye wearers to investigate mucoid discharge. *Clin Ophthalmol*. **6**, 707-13 (2012).
24. Gautam R, Singh RD, Sharma VP, Siddhartha R, Chand P, Kumar R. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. **100**, 1444-50 (2012).
25. Meriç G, Dahl JE, Ruyter IE. Cytotoxicity of silica-glass fiber reinforced composites. *Dent Mater*. **24**, 1201-6 (2008).
26. Schrader S, Notara M, Beaconsfield M, Tuft SJ, Daniels JT, Geerling G. Tissue engineering for conjunctival reconstruction: Established methods and future outlooks. *Curr Eye Res*. **34**, 913-24 (2009).
27. Hartung T, Daston G. Are in vitro tests suitable for regulatory use? *Toxicol Sci*. **111**, 233-7 (2009).
28. Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A. Toxicity assessment of industrial chemicals and airborne contaminants: Transition from in vivo to in vitro test methods: a review. *Inhal Toxicol*. **17**, 775-87 (2005).
29. Ukelis U, Kramer PJ, Olejniczak K, Mueller SO. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. *Regul Toxicol Pharmacol*. **51**, 108-18 (2008).
30. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*. **1**, 142-9 (2012).
31. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. **321**, 424 (2000).

32. 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.* **108**, 59-69 (2000).
33. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater.* **22**, 1086-92 (2006).
34. Barbosa DB, Barão VA, Monteiro DR, Compagnoni MA, Marra J. Bond strength of denture teeth to acrylic resin: Effect of thermocycling and polymerisation methods. *Gerodontology.* **25**, 237-44 (2008).
35. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont.* **21**, 7-15 (2012).
36. Fernandes AU, Portugal A, Veloso LR, Goiato MC, Santos DM. Assessment of the flexural strength of two heat-curing acrylic resins for artificial eyes. *Braz Oral Res.* **23**, 263-7 (2008).
37. Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Iyda MG, Rezende MC, Haddad MC. Effect of disinfection and storage on the flexural strength of ocular prosthetic acrylic resins. *Gerodontology.* **29**, e838-44 (2012).
38. Grabowska B, Sitarz M, Olejnik E, Kaczmarska K, Tyliczszak B. FT-IR and FT-Raman studies of cross-linking processes with Ca^{2+} ions, glutaraldehyde and microwave radiation for polymer composition of poly(acrylic acid)/sodium salt of carboxymethyl starch - In moulding sands, Part II. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **151**, 27-33 (2015).
39. Bass M, Freger V. Facile evaluation of coating thickness on membranes using ATR-FTIR. *J Memb Sci.* **492**, 348-54 (2015).
40. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, de Almeida FG, et al. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of

conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dent Mater.* **25**, 662-71 (2009).

41. Park JG, Ye Q, Topp EM, Spencer P. Enzyme-catalyzed hydrolysis of dentin adhesives containing a new urethane-based trimethacrylate monomer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **91**, 562-71 (2009).

42. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater.* **23**, 363-8 (2007).

43. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: *ISO* (2009).

44. Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, Rostène W, Baudouin C, Brignole-Bausouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* **18**, 851-63 (2012).

45. Bal BT, Yilmaz H, Aydın C, Karakoca S, Yilmaz S. *In vitro* cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: Effect of accelerated aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **89**, 122-6 (2009).

46. Gonçalves TS, Schmitt VM, Thomas M, De Souza MAL, De Menezes LM. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod.* **78**, 926-30 (2008).

47. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* **12**, 12347-60 (2012).

48. Bernabé DG, Tamae AC, Biasoli ÉR, Oliveira SHP. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav Immun.* **25**, 574-83 (2011).

49. Oliveira SHP, Santos VA. Studies on the expression of fibroblast growth factor-2 from odontoblast-like cells. *J Endod.* **37**, 1520-4 (2011).

50. Trubiani O, Toniato E, Di Iorio D, Diomede F, Merciaro I, D'Arcangelo C, et al.

- Morphological analysis and interleukin release in human gingival fibroblasts seeded on different denture base acrylic resins. *Int J Immunopathol Pharmacol.* **25**, 637-43 (2012).
51. Li Z, Wu X, Li J, Yao L, Sun L, Shi Y, et al. Antitumor activity of celastrol nanoparticles in a xenograft retinoblastoma tumor model. *Int J Nanomedicine* **7**, 2389-98 (2012).
52. Bural C, Aktas E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Kizilcan N, Bayraktar G. Effect of post-polymerization heat-treatments on degree of conversion, leaching residual MMA and in vitro cytotoxicity of autopolymerizing acrylic repair resin. *Dent Mater.* **27**, 1135-43 (2011).
53. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont.* **10**, 73-7 (1997).
54. 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.* **14**, 439-43 (2001).
55. 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.* **17**, 340-4 (2004).
56. Compagnoni MA, Barbosa DB, de Souza RF, Pero AC. The effect of polymerization cycles on porosity of microwave-processed denture base resin. *J Prosthet Dent.* **91**, 281-5 (2004).
57. Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci.* **106**, 588-93 (1998).
58. Waldmann TA. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Trends Pharmacol Sci.* **14**, 159-64 (1993).
59. Whittington R, Faulds D. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs.* **46**, 446-514 (1993).
60. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* **265**, 621-36 (1990).

61. Poormasjedi-Meibod MS, Pakyari M, Jackson JK, Salimi Elizei S, Ghahary A. Development of a nanofibrous wound dressing with antifibrogenic properties in vitro and in vivo model. *J Biomed Mater Res A* **104**, 2334-44 (2016).
62. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. In: *Imunologia celular e molecular*. 2^a ed. Rio de Janeiro: *Revinter*. 253-76 (1998).
63. Simon RH, Scott MJ, Reza MM, Killen PD. Type IV collagen production by rat pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **8**, 640-6 (1993).
64. Tirado-Rodriguez B, Ortega E, Segura-Medina P, Huerta-Yepez S. TGF- β : An important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. *J Immunol Res*. **2014**, 318481 (2014).
65. Yang K, Palm J, König J, Seeland U, Rosenkranz S, Feiden W, et al. Matrix-Metallo-Proteinases and their tissue inhibitors in radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Biol*. **83**, 665-76 (2007).
66. Michels J, Johnson PW, Packham G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol*. **37**, 267-71 (2005).
67. Yamada M, Kojima N, Att W, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. *N*-Acetyl cysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental resin extract. *Redox Rep*. **14**, 13-22 (2009).

Tabela 1. Ciclos de polimerização utilizados no estudo.

Água aquecida	Método de polimerização
P1 (Fabricante)	Imersão da mufla em água; aquecimento por 30 min; temperatura ambiente por 30 min; fervura a 100°C por 1 h
P2 ^{7,34}	Imersão da mufla em água a 74°C por 9 h
P3 ⁷	Imersão da mufla em água a 74°C por 9 h, seguido de armazenamento em água (fervura a 100°C por 30 min)
P4 ^{7,17}	Imersão da mufla em água a 74°C por 9 h seguido de armazenamento em água (fervura a 100°C por 3 h)
P5 ^{7,11}	Imersão da mufla em água a 74°C por 30 min, seguido de armazenamento em água (fervura a 100°C por 30 min)
Microondas	Método de polimerização
P6 (Fabricante)	Mufla no microondas com potências de 320 W (30%) (3 min), 0 W (0%) (4 min) e 720 W (60%) (3 min)
P7 ^{14,34}	Mufla no microondas com potência de 500 W (3 min)
P8 ³⁴	Mufla no microondas com potência de 90 W (13 min) e 500 W (90 seg)
Ativação química	Método de polimerização
P9 (Fabricante)	Mufla aberta em panela de pressão com a quantidade necessária de água, 20 libras de ar comprimido e polimerização por 20 min
P10 ^{17,34}	Mufla aberta sobre a bancada para polimerização da resina à temperatura ambiente
P11 ¹⁷	Mufla aberta sobre a bancada para polimerização da resina à temperatura ambiente, seguido de armazenamento em água a 60°C por 30 min

Tabela 2. Concentração (pg/mL) dos mediadores inflamatórios avaliados no ELISA.

	IL-2	IL-6	IL-23	IL-28A	IL-17E	IL-4	IL-27	IL-31	GM-CSF	CCL20	IL-17F	IL-9
Controle	49.000	124,4	58,5	45,0	41,8	28,4	37,0	37,2	20,8	17,5	9,7	7,5
P1	112.000	150,6	287,0	31,7	39,7	20,5	30,9	27,6	18,8	13,2	9,8	8,9
P2	1.734.000	163,9	119,5	27,1	37,2	24,2	43,5	31,0	13,6	10,9	7,0	10,1
P3	245.000	218,4	141,0	44,1	51,0	34,7	35,5	18,7	16,9	17,5	10,5	11,0
P4	687.000	152,2	70,0	26,6	46,0	22,4	32,7	18,1	10,9	13,1	8,0	7,9
P5	8.591.000	175,1	53,8	32,8	39,1	43,9	24,3	33,9	13,2	12,9	7,1	7,1
P6	732.000	172,4	140,6	33,4	34,9	16,8	32,2	27,1	14,2	16,6	10,8	10,0
P7	1.322.000	185,6	534,2	14,0	40,2	29,4	24,8	40,3	15,0	12,8	12,9	8,8
P8	39.297.000	247,1	189,7	68,0	32,5	43,0	46,1	27,0	12,1	17,8	15,4	10,6
P9	309.000	319,5	188,1	45,7	38,5	28,7	25,1	27,3	14,9	10,7	8,9	7,1
P10	9.969.000	318,7	191,9	54,9	23,4	32,0	25,2	28,8	14,7	7,3	9,1	6,8
P11	141.000	277,8	185,4	59,1	39,8	29,7	31,1	25,0	13,7	16,8	11,6	13,2

Tabela 2 (continuação). Concentração (pg/mL) dos mediadores inflamatórios avaliados no ELISA.

	IFN- γ	IL-15	IL-5	IL-13	IL-21	IL-22	IL-12	IL-1 β	IL-17A	TNF- α	IL-10	IL-33
Controle	5,9	10,2	5,3	4,4	4,8	4,8	3,5	2,1	2,9	1,5	2,2	0,3
P1	5,8	7,5	4,4	5,0	3,5	3,1	2,7	2,0	2,5	1,4	0,7	0,04
P2	5,9	4,7	5,0	5,2	2,4	2,2	2,3	1,4	2,8	1,5	0,8	0,3
P3	11,7	6,3	5,8	4,2	4,9	3,1	3,6	3,0	1,8	0,6	1,2	0,03
P4	2,0	7,2	6,1	2,8	2,8	2,2	1,3	2,3	2,2	1,5	1,4	0,2
P5	8,4	6,5	6,5	2,9	2,6	7,7	2,8	2,9	1,4	1,4	0,9	0,02
P6	5,4	7,4	5,1	6,5	6,3	3,8	2,5	3,5	1,8	1,6	0,7	0,01
P7	3,4	5,0	9,6	6,4	2,7	1,1	2,6	2,1	3,4	0,3	0,2	0,1
P8	7,5	3,4	5,2	5,5	6,8	1,9	3,6	6,5	2,2	0,9	0,5	0,3
P9	5,8	7,8	3,3	3,8	3,9	1,8	2,3	2,2	1,7	0,7	0,7	0,07
P10	3,6	3,5	5,9	2,6	4,0	4,2	2,5	2,9	2,6	1,5	2,0	0,03
P11	11,5	4,5	9,1	6,0	4,8	2,0	4,5	2,4	1,9	1,4	0,7	0,01

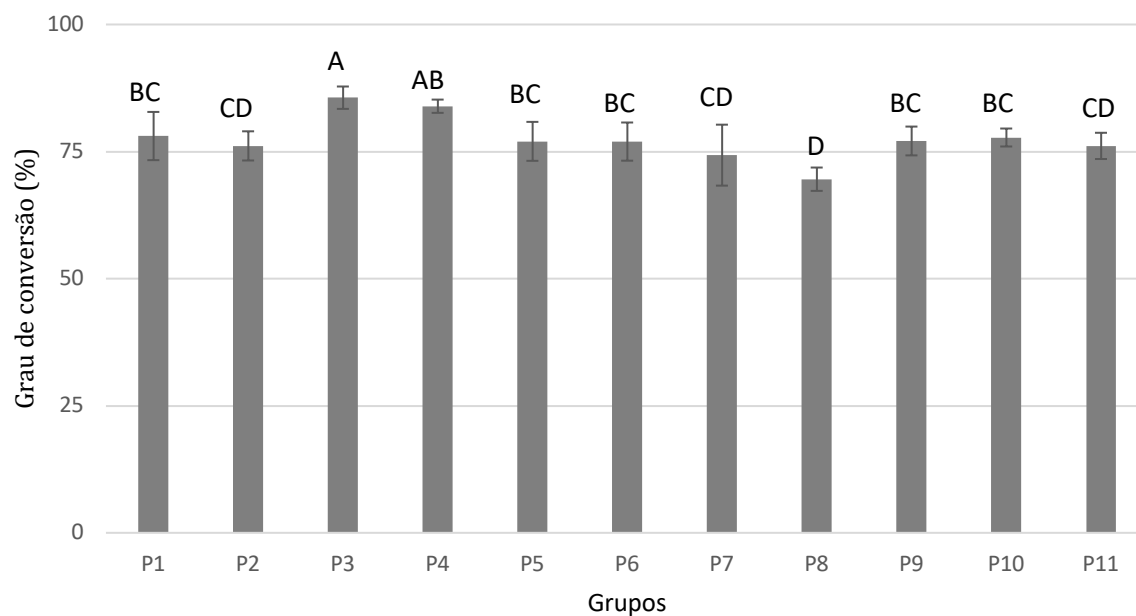


Figura 1. Percentuais $\pm$ desvio padrão de grau de conversão para os diferentes grupos testados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

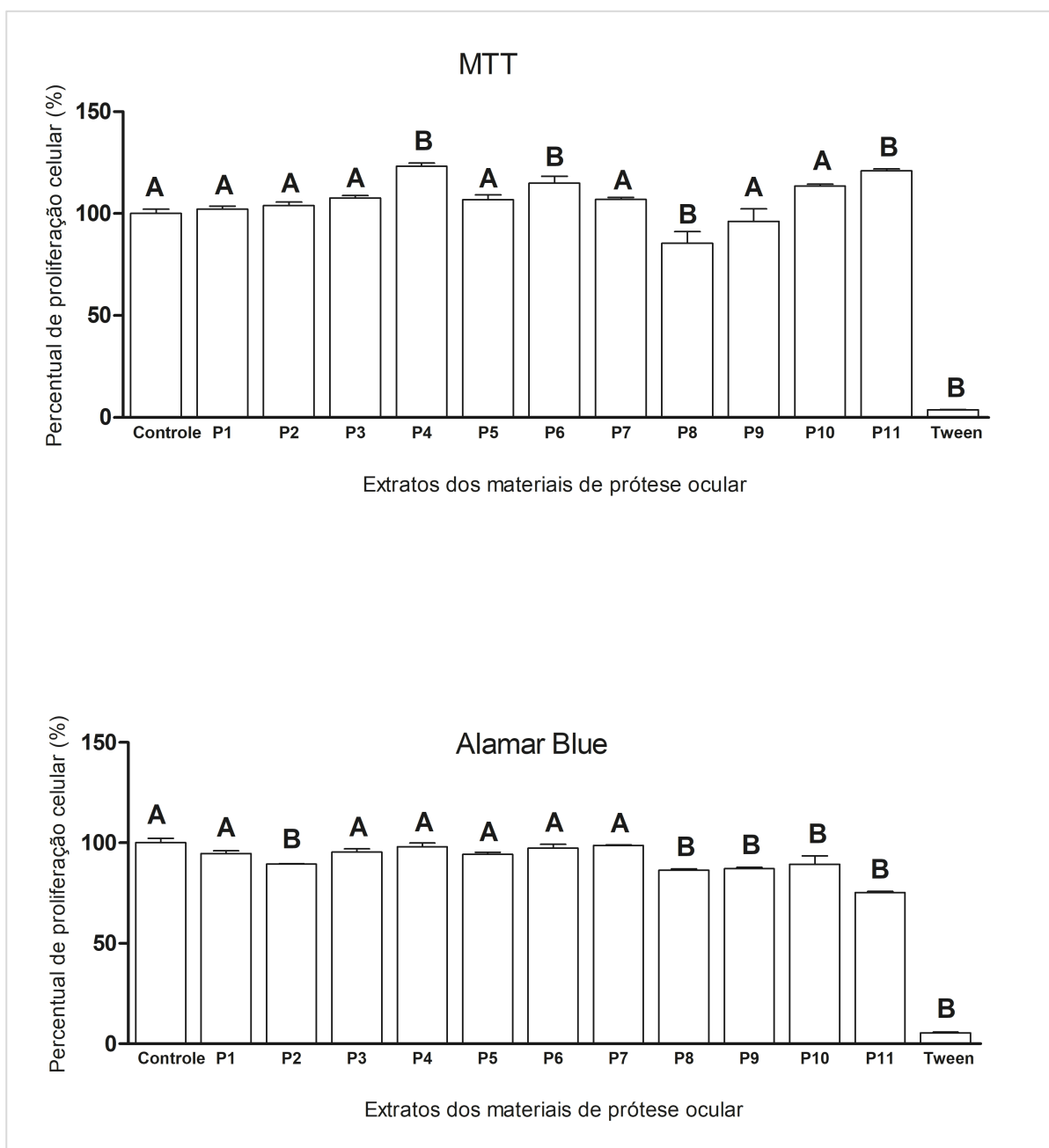


Figura 2. Percentuais de proliferação celular obtidos nos ensaios de MTT e Alamar Blue para os diferentes grupos testados. Os resultados mostram média $\pm$ erro padrão dos percentuais de proliferação celular de cada grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao respectivo grupo não estimulado.

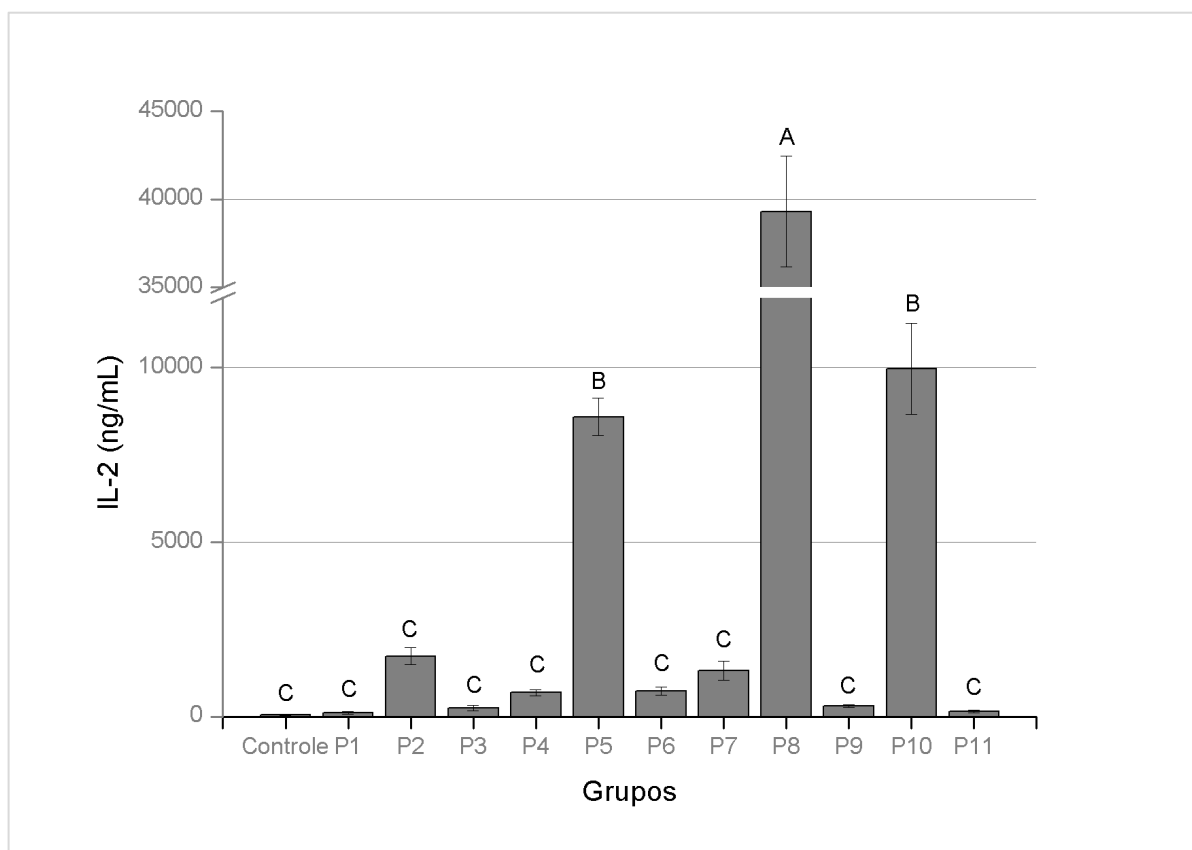


Figura 3. Concentração de IL-2 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos avaliados.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

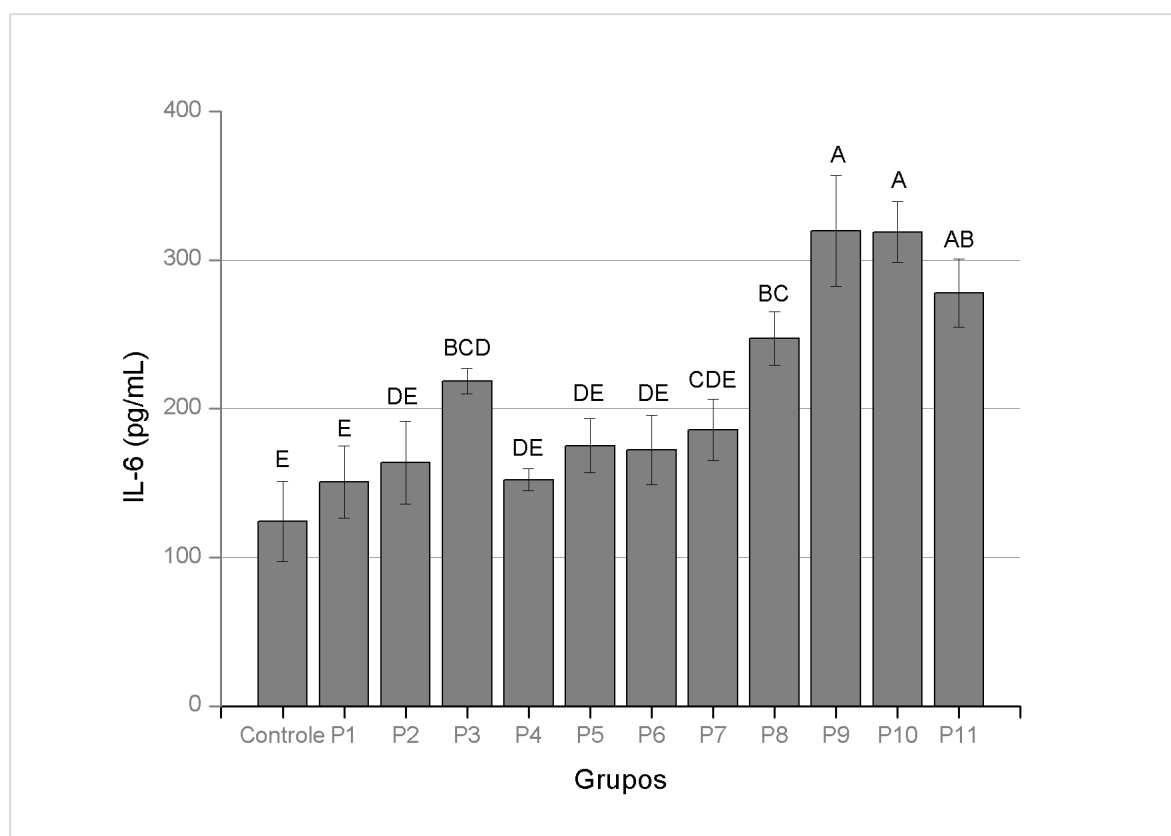


Figura 4. Concentração de IL-6 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos avaliados.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

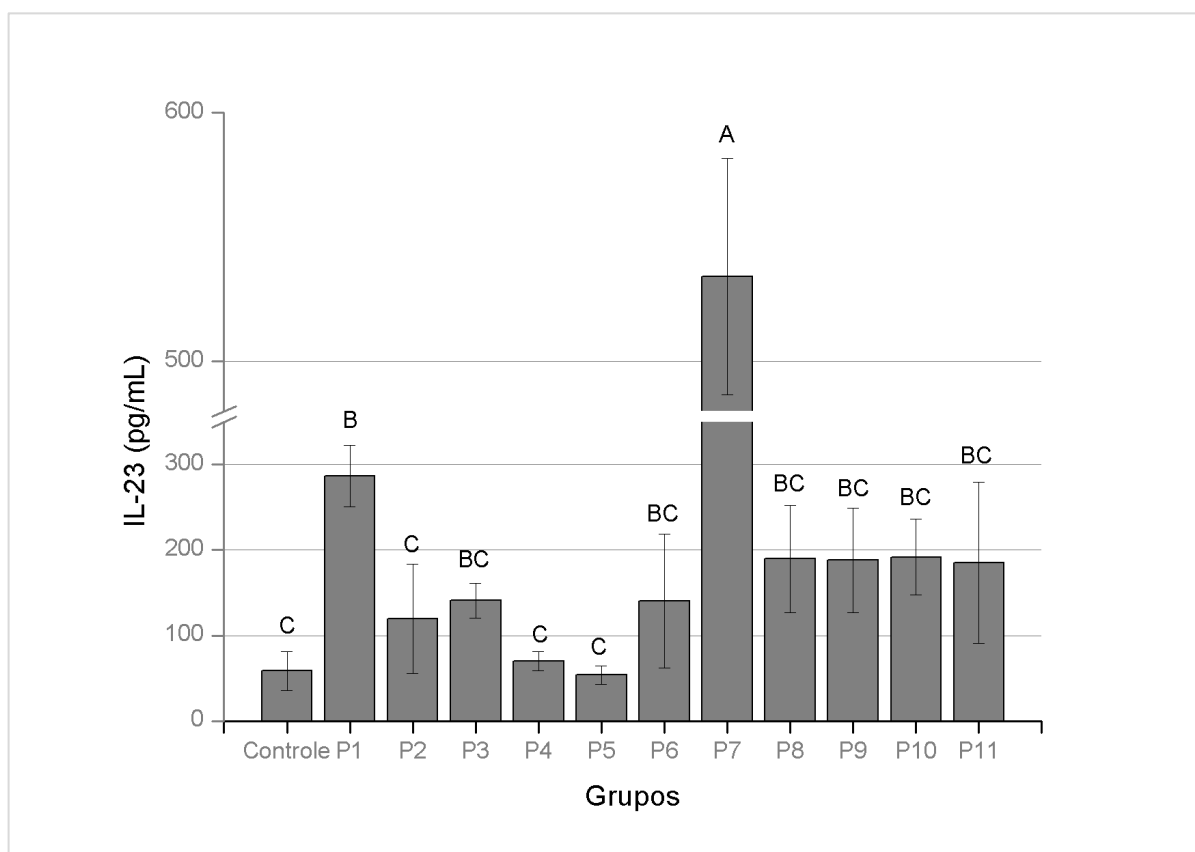


Figura 5. Concentração de IL-23 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos avaliados.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

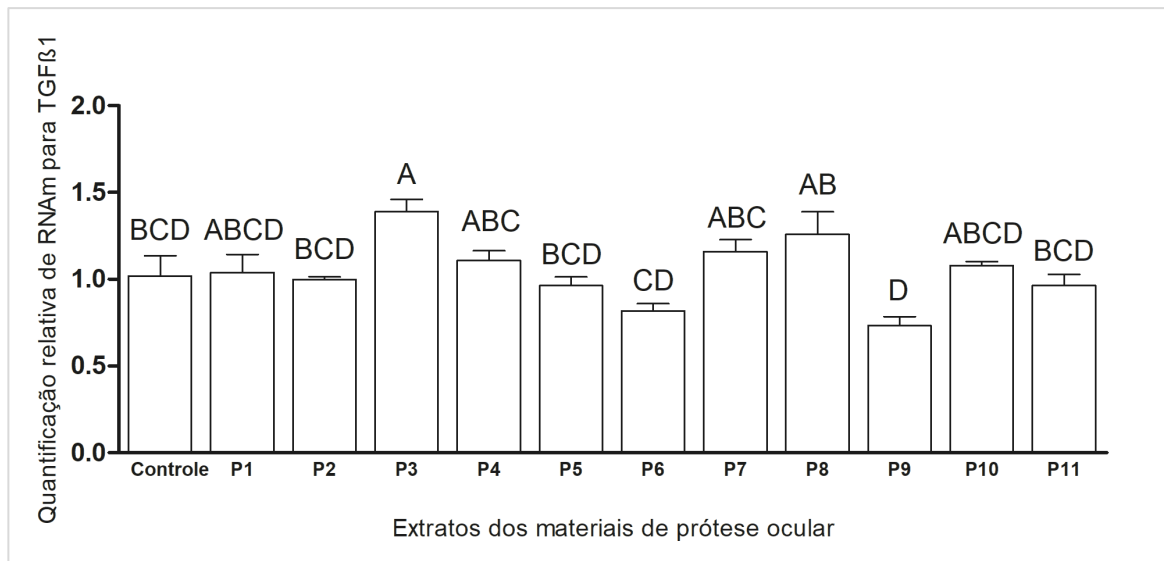


Figura 6. Quantificação relativa de RNAm para TGF β 1 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos testados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

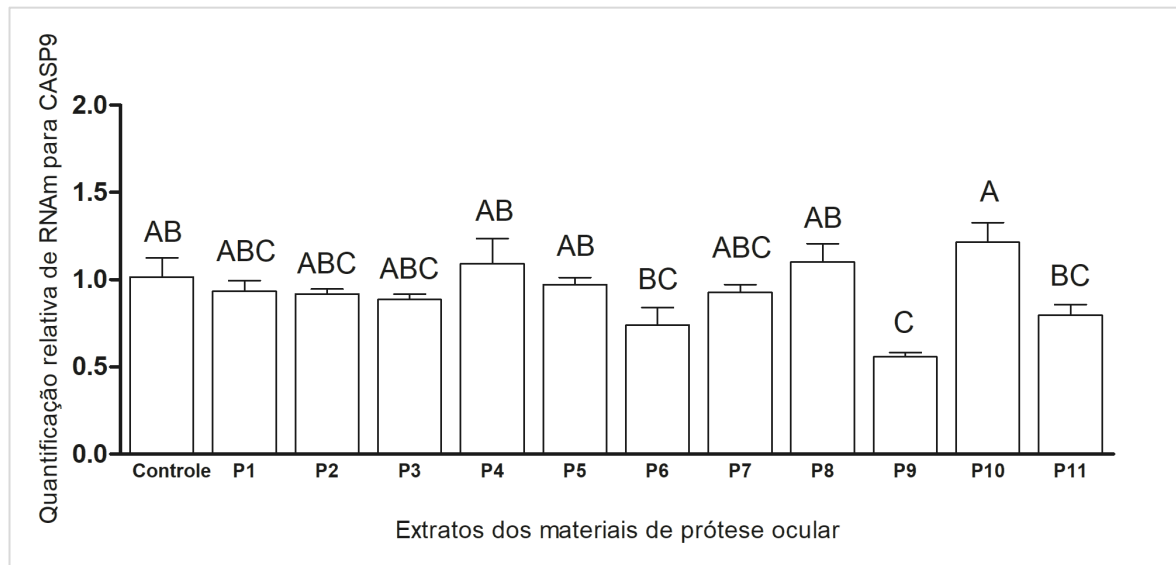


Figura 7. Quantificação relativa de RNAm para CASP9 $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos testados. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

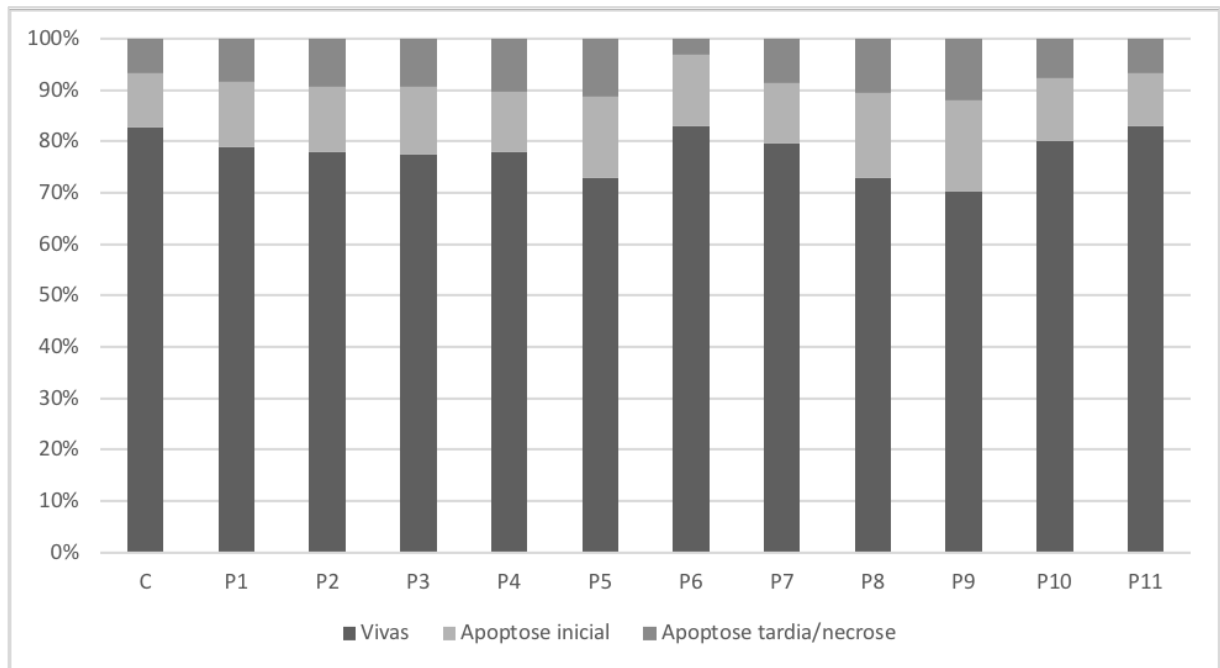


Figura 8. Gráfico em barra quantificando o percentual de células da conjuntiva vivas (Anexina V negativo/PI negativo), em estágio de apoptose inicial (Anexina V positivo/PI negativo) e, em estágio de apoptose tardia/necrose (Anexina V positivo/PI positivo), de acordo com os tratamentos testados.

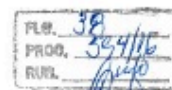


4. Anexos

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Biocompatibilidade da resina acrílica de prótese ocular: análise in vitro e in vivo", Processo FOA nº 00594-2016, sob responsabilidade de Marcelo Coelho Goiato apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de Abril de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Maio de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Junho de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Biocompatibility of ocular prosthesis acrylic resin: in vitro and in vivo analysis", Protocol FOA nº 00594-2016, under the supervision of Marcelo Coelho Goiato presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 19, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 01, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 01, 2018.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3638-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B - NORMA DA REVISTA SELECIONADA PARA A PUBLICAÇÃO DOS ARTIGOS

Este artigo será formatado de acordo com as normas do periódico *Biomaterials*, disponível em:

<https://www.elsevier.com/journals/biomaterials/0142-9612/guide-for-authors>