

DANIELE LUCCA LONGO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INDUZIDAS POR RESINA COMPOSTA FOTOPOLIMERIZÁVEL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DA PRESENTE OBRA,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Daniele Lucca Longo

FICHA CATALOGRÁFICA

Longo, Daniele Lucca

Avaliação da Citotoxicidade e Expressão de Citocinas Induzidas por Resina Composta Fotopolimerizável, 2013.

91p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

1. Resina à base de metacrilato; 2. Resina à base de silorane; 3. Resina Composta; 4. Citotoxicidade; 5. Citocinas

FOLHA DE APROVAÇÃO

LONGO, DL. **Avaliação da Citotoxicidade e Expressão de Citocinas Induzidas por Resina Composta Fotopolimerizável**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DANIELE LUCCA LONGO

DADOS CURRICULARES

- Nascimento** 11 de agosto de 1988 – Cravinhos –SP
- Filiação** José Cláudio Longo
Rosana Aparecida Lucca Longo
- 2006-2010** Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- 2009-2010** Iniciação científica – Projeto de pesquisa intitulado “Ação de um higienizador de próteses totais à base de própolis frente à *Candida sp*”.
(Bolsa Fapesp)
- 2011-2012** Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- 2011-2013** Curso de Especialização em Odontopediatria
Associação Odontológica de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto/SP
- 2011-2013** Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de Concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

“A Felicidade Exige Valentia!”

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

FERNANDO PESSOA

DEDICO ESTE TRABALHO

À Deus, luz da minha vida, por me dar força, coragem e paciência para que eu pudesse buscar e tornar os meus sonhos reais. Guie sempre meus passos e pensamentos...

Aos meus pais, exemplo de vida...

José Cláudio Longo, pelo exemplo de simplicidade e honestidade. Por sempre me apoiar em qualquer decisão que eu tome, por todas oportunidades de estudo e condições que me ofereceu em todos os momentos da minha vida e por ser a força que nos une como família. Obrigada pela dedicação e carinho. Amo você...

Rosana Aparecida Lucca Longo, por ser o coração da nossa família. Por me ensinar a fazer tudo com amor e a me doar ao máximo naquilo que me proponho a fazer. Tenho muito orgulho de ser sua filha. É uma grande virtude tê-la em minha vida...

Às minhas irmãs, minhas verdadeiras aliadas...

Graziele Lucca Longo e Franciele Lucca Longo, por serem tão fundamentais e iluminadas. Por sermos tão diferentes e iguais ao mesmo tempo. Por sermos três, e sermos uma. Por serem lindas, por dentro e por fora. Obrigada pelo companheirismo, cumplicidade e por sempre confiarem em mim...

Ao meu namorado, meu melhor amigo...

Fernando Cunha Biagini, pelo apoio incondicional, companhia, paciência e suporte. Admiro muito a sua inteligência, caráter e calma. Você é essencial na minha vida...

À minha segunda mãe,

Silvana de Fátima Rodrigues Lucca Caetano, pelo carinho e alegria explícitos diante de todas as conquistas que presenciou. Pela atenção, zelo e cuidado que me fizeram sentir como sua filha ao invés de sobrinha. Pelo sorriso sempre verdadeiro...

A todos os meus familiares e amigos que sempre torceram por mim!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profª. Dra. Lêa Assed Bezerra da Silva**, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, por acreditar na minha capacidade e pelos desafios propostos. Obrigada pelos ensinamentos, confiança e pela contribuição imensurável na minha formação científica. Espero ter alcançado as suas expectativas!

Ao **Dr. Francisco Wanderlei Garcia de Paula e Silva**, por todas as orientações durante o período do Mestrado. Muito obrigada pela disponibilidade, paciência, apoio, incentivo, amizade e por tanto ensinamento científico e de vida. Minha singela homenagem à uma das pessoas mais admiráveis que tive a oportunidade de conhecer.

A **Profª. Dra. Lúcia Helena Faccioli**, por ter me acolhido em seu laboratório de forma tão cordial e atenciosa, por ter contribuído com meu aprendizado e crescimento profissional. Obrigada pelas contribuições nesse trabalho, sempre tão enriquecedoras.

Ao **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**, pela contribuição à minha formação profissional, estímulo e amizade. Modelo de professor para mim e para todos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual reitor, **Prof. Dr. João Grandino Rodas**, e do vice-reitor, **Prof. Dr. Hélio Nogueira da Cruz**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor, **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros**, e da vice-diretora, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e do vice-coordenador **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**.

À **CNPq**, pela bolsa concedida.

Aos professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Profª. Dra. Sada Assed**, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**, **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profª. Dra. Andriara de Rossi**, **Profª. Dra. Cristina Borsatto**, **Profª. Dra. Kranya Serrano**, **Profª. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva** pelo incentivo, ensinamentos e colaboração durante minha formação acadêmica e científica. Pela seriedade e profissionalismo com que desempenham a função de ensinar.

Aos professores da disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Profª. Dra. Míriam Aiko Nakane Matsumoto**, **Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani**, pelos ensinamentos transmitidos.

À **Dra. Marília Pacífico Lucisano**, por ser tão gentil e atenciosa. Pela convivência extremamente agradável ao longo desses dois anos e por toda ajuda concedida em todos momentos que precisei.

Aos demais Funcionários do Departamento de Clínica Infantil: **Francisco Wanderlei Garcia de Paula e Silva, Carolina Paes Torres Mantovani Nilza Letícia Magalhães, Marco Antônio dos Santos, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Tatiana Goudromihos, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Matheus Morelli Zanela e Filomena Leli Placciti**, pela disponibilidade, atenção e convivência agradável.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: **Benedita Viana Rodrigues, Fátima Aparecida Rizoli e Renata Aparecida Fernandes, José Aparecido Neves do Nascimento, Vera do Nascimento Scandelay e Karina Daqalt Quaglio** por todo carinho e atenção para com os alunos e pacientes e todo apoio nas atividades clínicas.

Aos **funcionários e pós-graduandos do LIIP e LIME** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela disponibilidade, prestatividade e ajuda dispensada a mim durante todo o período em que realizei o experimento no laboratório.

Aos Pós-Graduandos em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Ana Caroline Fumes, Ana Zilda Nazar Bérqamo, Cristina Bueno Brandão, Daniela Silva Barroso de Oliveira, Danielly Cunha Araújo Ferreira, Denise de Souza Matos, Driely Barreiros de Oliveira, Fernanda Regina Ribeiro Santos, Gabriela Cristina Sautin, Giselle de Ângelo Leite Carbonaro Guerreiro, Karina Grecca Pieroni, Késsia Suênia Fidélis de Mesquita, Katharina Morant Holanda de Oliveira, Letícia Andreotti Bignardi, Lidia Regina da Costa Hidalgo, Larissa Nogueira Soares Ribeiro, Marcela Cristina Damiano Andrucio, Mariana Alencar Nemezio, Marília Rodrigues Moreira, Marina Fernandes de Sena, Marta Maria Martins Giamatei Contente, Maya Arnez, Priscilla Coutinho Romualdo, Rodrigo Teixeira Macri, Silvana Polizeli, Talita Pereira Prates, Talitha de Siqueira Mellara**, pelo incrível "intercâmbio cultural", por todo o apoio, troca de experiências e pela convivência sempre tão agradável.

Às minhas queridas amigas de turma do Mestrado, **Ana Caroline Fumes, Denise de Souza Matos, Katharina Morant de Oliveira, Mariana Alencar Nemezio, Priscilla Coutinho Romualdo**, que são pessoas que ficarão para sempre dentro do meu coração e das minhas lembranças. Fizeram toda a diferença nos pequenos detalhes do dia-a-dia. Espero sempre tê-las por perto...

Às minhas amigas: **Nádia Rossi** e **Naya Ringer**, por serem muito mais do que amigas. Onde quer que esteja carregue vocês no meu coração.

Aos meus amigos queridos da minha terra natal, **Fernando Medeiros**, **Weyder Ceron** e **Aline Villas Bôas**, pessoas iluminadas que deixam minha vida mais feliz.

Aos meus **familiares**: tios, tias, primos, avós, pelo incentivo, suporte e afeto! Muito obrigada por sempre torcerem e confiarem em mim. Sem vocês esse sonho não teria se realizado.

À secretária do curso de Especialização de Ortodontia **Rosemary Alves de Sá** pela formatação deste trabalho.

À equipe da **Clic Foto e Vídeo** pela impressão do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	PROPOSIÇÃO.....	31
3	MATERIAL E MÉTODO.....	35
4	RESULTADOS.....	45
5	DISCUSSÃO.....	69
6	CONCLUSÃO.....	77
7	REFERÊNCIAS.....	81

RESUMO

Longo, DL. **Avaliação da Citotoxicidade e Expressão de Citocinas Induzidas por Resina Composta Fotopolimerizável.** Ribeirão Preto, 2013. 91p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2013.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, o comportamento citotóxico e a produção de citocinas induzidos pelos materiais restauradores resinosos contendo novos monômeros Kalore™ (GC FUJI) e Filtek™ Silorane (3M ESPE) em comparação com as resinas compostas convencionais Charisma® (Heraeus-Kulzer) e Filtek™ Z250 (3M ESPE), em cultura de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 de camundongos. As células foram estimuladas com as resinas compostas, fotopolimerizadas ou não, a partir da colocação em contato indireto ou pela extração de seus componentes durante 15, 45 e 120 dias. Após a incubação por 6, 12 e 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada pelo Ensaio MTT e a produção de citocinas foi investigada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$). A produção de TNF- α e IL-6 não foi detectada em fibroblastos da linhagem L929, após 6, 12 e 24 horas de contato indireto com as resinas compostas Kalore™ e Filtek™ Silorane. Por outro lado, a produção de TNF- α foi detectada em macrófagos da linhagem RAW 264.7, mas não foi influenciada pelo contato indireto com as resinas compostas, com exceção da resina Filtek™ Silorane que inibiu a produção de TNF- α , após 12 horas de incubação. Os extratos obtidos das resinas compostas Kalore™ e Filtek™ Silorane incubadas por 15 dias, se mostraram mais citotóxicos do que os extratos incubados por 45 e 120 dias. A citotoxicidade da resina composta Kalore™ não foi influenciada pela fotopolimerização enquanto a citotoxicidade da resina Filtek™ Silorane foi maior no grupo não fotopolimerizado. Os extratos das resinas compostas Charisma® e Filtek™ Z250, obtidos aos 15, 45 e 120 dias de incubação, não foram citotóxicos 24 horas após a estimulação das células. Ainda, a resina Filtek™ Silorane, fotopolimerizada ou não, estimulou a produção de IL-6 no período de 45 dias de extração. A resina Kalore™, diferentemente da resina Filtek™ Silorane, estimulou a produção de IL-10, aos 15 dias de extração. Entretanto, no período de 45 de extração, a resina Kalore™ fotopolimerizada inibiu a produção de IL-10, após 12 horas de incubação, e aos 120 dias de extração não houve produção detectável de IL-10 em nenhum dos grupos avaliados.

Palavras-chave: resina à base de metacrilato, resina à base de silorane, resina composta, citotoxicidade, citocinas.

ABSTRACT

Longo, DL. **Evaluation of the Cytotoxicity and Cytokine Expression Induced by Light-Cured Composite Resins.** Ribeirão Preto, 2013. 91p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;2013.

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the cytotoxicity and the production of cytokines induced by resin-based restorative materials containing new monomers Kalore™ (GC FUJI) and Filtek™ Silorane (3M ESPE) compared with conventional composite resins Charisma® (Heraeus-Kulzer) and Filtek™ Z250 (3M ESPE), in mice L929 fibroblast and RAW 264.7 macrophages culture. Cells were stimulated with the composite resins, light-cured or not, by indirect contact or extraction during 15, 45, and 120 days. After incubation for 6, 12, and 24 hours, cell viability was assessed by MTT assay and production of cytokines was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data obtained were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-test ($\alpha = 0.05$). Production of TNF- α and IL-6 was not detected in L929 fibroblasts either 6, 12 or 24 hours following indirect contact with the Kalore™ and Filtek™ Silorane composite resins. On the other hand, the production of TNF- α was detected in RAW 264.7 macrophages, but was not influenced by indirect contact with composite resins, with the exception of the Filtek™ Silorane resin that inhibited the production of TNF- α , after 12 hours of incubation. The extracts obtained from incubation for 15 days with composite resins Kalore™ and Filtek™ Silorane were more cytotoxic than extracts incubated for 45 and 120 days. Cytotoxicity of composite Kalore™ was not influenced by light curing while cytotoxicity of Filtek™ Silorane resin was higher in the group that not received light-cure. Extracts of Charisma® and Filtek™ Z250 composite resins, obtained at 15, 45, and 120 days of incubation, were not cytotoxic 24 hours after stimulation of the cells. Also, Filtek™ Silorane, light-cured or not, stimulated the production of IL-6 following 45 days of incubation. Kalore™ resin extract for 15 days, unlike Filtek™ Silorane resin, stimulated the production of IL-10. However, during periods of 45 days of extraction, Kalore™ resin, light-cured, inhibited the production of IL-10, after 12 hours of incubation, and 120 days of extraction there was no detectable production of IL-10 in any of the groups.

Keywords: methacrylate-based resin, silorane-based resin, composite resin, cytotoxicity, cytokines.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, as primeiras resinas compostas, à base de metacrilato, foram desenvolvidas no final da década de 40 pelos alemães, como polímeros de cianoacrilato. Estas resinas eram conhecidas pelo nome de Eastman 910, e apresentavam comportamento adequado em nível laboratorial, porém quando empregadas clinicamente, apresentavam baixa resistência ao desgaste, evaporação do monômero e alta contração de polimerização, o que fazia com que se deslocassem facilmente das paredes da cavidade permitindo a ocorrência de infiltração marginal (Sölderholm e Mariotti, 1999; Taylor et al., 1998; Rawls e Esquivel-Upshaw, 2005).

A principal inovação ocorreu quando esses materiais foram substituídos pelas resinas epóxi-acrílicas, desenvolvidas por Bowen em 1962, que são dimetacrilatos resultantes da reação do éter bisfenol A com o glicidil metacrilato, sendo esta a base da maioria das resinas compostas atualmente comercializadas (Bowen e Marjenhoff 1992; Taylor et al., 1998; Sölderholm e Mariotti, 1999; Rawls e Esquivel-Upshaw, 2005; Ilie e Hickel, 2011a; Radz, 2013). Desde então, grandes avanços e modificações na composição das resinas compostas têm sido realizados, como o emprego de monômeros de baixa contração e alto peso molecular, no intuito de superar os efeitos da contração de polimerização, uma das principais deficiências quanto às propriedades mecânicas e químicas das resinas compostas (Eick et al., 2005; Rodrigues Junior et al., 2008; Naoum et al., 2012).

Os principais componentes das resinas compostas são a matriz orgânica; as partículas de preenchimento; o agente de união, que liga as partículas de preenchimento à matriz orgânica da resina; o sistema ativador, que inicia a polimerização; os pigmentos, que permitem obter colorações semelhantes aos dentes e os inibidores da polimerização, que aumentam a vida útil do material, bem como o tempo de trabalho (Peutzfeldt, 1997; Asmussen e Peutzfeldt, 1998; Anusavice, 2005).

O material de preenchimento é de natureza inorgânica, formado por partículas de substâncias minerais como quartzo, sílica, silicato de alumínio, vidro de bário, fibras de vidro, entre outros (Phillips, 1991; Rodrigues Junior et al., 2008). O material de preenchimento não parece desempenhar um papel importante na compatibilidade biológica do material, diferentemente do componente orgânico das resinas compostas (Goldberg, 2008).

A matriz orgânica da resina composta é constituída, na maioria dos casos, por Bisfenol-A glicidilmetacrilato (Bis-GMA). Nas últimas décadas, foram desenvolvidos outros tipos de monômeros, aromáticos e/ou alifáticos, tais como o dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), o dimetacrilato de uretano (UDMA), o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e o

bisfenol A dimetacrilato etoxilado (Bis-EMA) (Ferracane, 1995; Anusavice, 2005), que estabelecem ligações cruzadas no momento da polimerização e conferem resistência ao material (Peutzfeldt, 1997; Rueggeberg, 2002; Palin et al., 2003; Ferracane, 2005).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas novas resinas à base de metacrilato com modificações em sua composição, estrutura e natureza de polimerização, como a resina Kalore™. Esta resina de partículas nanohíbridas, produzida pela GC FUJI (Kasugai, Japão), é composta por fluoroaminosilicato de vidro (componente inorgânico); canforoquinona (iniciador); UDMA, DX-511 (monômero Dupont de alto peso molecular) e co-monômeros inespecíficos (matriz orgânica) (Kalore™ GC FUJI, 2009).

O monômero de metacrilato DX-511, componente da resina Kalore™, é constituído por uma molécula de núcleo longo e rígido, com ramificações laterais flexíveis e baixo número de ligações duplas de carbono (Ilie e Hickel, 2011a), o que confere uma menor contração de polimerização em relação aos compósitos convencionais à base de metacrilato (Dopheide et al., 2010).

Em estudos internos da Empresa, a resina Kalore™ foi empregada clinicamente, e demonstrou propriedade estética, além de resultados mecânicos muito favoráveis à sua indicação (Kalore™ GC FUJI, 2009; Terry et al., 2009). Entretanto, os efeitos citotóxicos da resina composta bem como a avaliação da compatibilidade tecidual ainda não foram investigados.

Por outro lado, a resina composta Filtek™ Silorane, introduzida no comércio pela 3M ESPE (Seefeld, Alemanha), não é constituída de monômero de metacrilato. Esta resina contém partículas microhíbridas e apresenta como componentes o quartzo e o fluoreto de ítrio (componente inorgânico); a canforoquinona (sistema iniciador) e moléculas de siloxane e oxirane como matriz orgânica (Weinmann et al., 2005; 3M ESPE, 2004, 2005; Prachi e Rujuta et al. 2008).

O nome "Silorane" deriva da reação entre siloxane e oxirane, componentes químicos da matriz orgânica. A combinação dessas duas moléculas reduz a contração de polimerização do material restaurador e aumenta a estabilidade de cor, em comparação aos metacrilatos convencionais (Weinmann et al., 2005; Terry et al., 2009; Boaro et al., 2010; Lien e Vanderwalle, 2010; Boulden et al., 2011; Zimmerli et al., 2010; Ilie e Hickel, 2011b; Gao et al., 2012) por apresentar características como hidrofobicidade e insolubilidade em água (Kopperud et al., 2010) ou em fluidos biológicos (Eick et al., 2005 e 2007). Diversos estudos têm avaliado as propriedades físico-químicas das resinas à base de silorane, demonstrando significativamente menor contração de polimerização e adaptação marginal melhorada, comparado aos compostos à base de metacrilato (Eick et al., 2007; Bagis et al., 2009; Lien e

Vanderwalle, 2010; Kopperud et al., 2010; Ilie e Hickel, 2011b; Yaman et al., 2011; Gregor et al., 2012).

Embora melhorias nas propriedades físico-químicas sejam importantes, o sucesso clínico de um material odontológico depende fundamentalmente da sua compatibilidade tecidual. Phillips (1991) definiu como características ideais dos materiais dentários, que eles sejam inofensivos ao tecido pulpar e aos tecidos adjacentes, livres de agentes potencialmente alergênicos, e ainda, que não contenham substâncias tóxicas que possam ser absorvidas para o sistema circulatório e provoquem resposta sistêmica. Nesse sentido, o sucesso biológico de um material depende, além de não causar prejuízo ao tecido, de desempenhar a sua função e modular positivamente a resposta do organismo (Williams, 2008; Wataha, 2012).

A compatibilidade biológica dos materiais resinosos é, predominantemente, determinada pela quantidade e pela natureza dos componentes orgânicos (Jontell et al., 1998; Geurtsen, 2000; Braga e Ferracane, 2004; Brackett et al., 2007; Emmeler et al., 2008; Goldberg, 2008; Pfeifer et al., 2008; Urcan et al., 2010; Wisniewska-Jarosinska et al., 2011; Yang, 2012; Ausiello et al., 2013; Orimoto et al., 2013). Ainda, os efeitos adversos são causados por substâncias liberadas a partir da matriz da resina na cavidade bucal ou polpa, devido à polimerização incompleta, à degradação da resina ao longo do tempo (Hume e Gerzina, 1996; Shajii e Santerre, 1999; Geurtsen, 2000; Örtengren, 2000; Fung et al., 2000; Santerre et al., 2001; Jaffer et al., 2002; Schmalz, 2002; Eliades et al., 2003; Bouillaguet, 2004; Finer e Santerre, 2004; Goldberg e Smith, 2004; Ferracane, 2005; Brackett et al., 2007) e/ou pela ação enzimática da saliva (Wisniewska-Jarosinska et al., 2011).

Os componentes liberados a partir das resinas compostas à base de metacrilato (convencionais) são monômeros residuais, ou seja, monômeros que não polimerizaram (Brackett et al., 2007; Schmalz et al., 2011). A liberação desses compostos não polimerizados dos materiais resinosos tem sido relacionada com genotoxicidade (Geurtsen et al., 1998; Schweikl et al., 2001; Kleinsasser et al., 2004; Schweikl et al., 2005; Kleinsasser et al., 2006; Goldberg, 2008; Urcan et al., 2010), estrogenicidade (Olea et al., 1996; Schafer et al., 1999; Pulgar et al., 2000; Tarumi et al., 2000; Ashby, 2002; Völkel et al., 2002; Wada et al., 2004; Schweikl et al., 2005; Goldberg, 2008), alterações do sistema imune (Rakick et al., 1999; Kostoryz et al., 2009), hipersensibilidade, citotoxicidade (Rathbun et al., 1991; Geurtsen et al., 1998; Wataha et al., 1999; Bouillaguet et al., 2000; Geurtsen, 2000; Kleinsasser et al., 2004; Schweikl et al., 2005; Becher et al., 2006; Kleinsasser et al., 2006; Goldberg, 2008; Chang et al., 2010; Wisniewska-Jarosinska et al., 2011; Kuan et al.,

2012) e produção de espécies reativas de oxigênio (Schweikl et al., 2006; Chang et al., 2010; Schmalz et al., 2011).

Especificamente quanto aos efeitos citotóxicos, sabe-se que os monômeros, isoladamente, causam diversos efeitos biológicos em células, tais como danos à membrana celular, inibição da atividade de enzimas do metabolismo celular, atraso e interrupção do ciclo celular, mutação genética, quebra da cadeia de DNA e apoptose por redução de GSH (glutathiona) via estresse oxidativo (Schweikl et al., 2005). Estudos em cultura de células têm mostrado que os monômeros dimetacrilatos (bis-GMA e TEGDMA) podem provocar, em concentrações subtóxicas, um aumento do recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação (Kostoryz et al., 2009) e induzir a expressão de citocinas, *in vitro* (Gregson et al., 2008). Os monômeros resinosos, ao suprimir a atividade das mitocôndrias nas células, alteraram a capacidade de resposta inflamatória de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), inibindo a secreção das citocinas fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β). Estes resultados indicam os monômeros podem ser prejudiciais à resposta inflamatória ao alterar uma das principais funções dos macrófagos (Rakich et al., 1998; Rakich et al., 1999). Interessantemente, o monômero Bis-GMA também apresentou-se citotóxico sobre os macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, mas estimulou a secreção da citocina pró-inflamatória TNF- α de forma dose-dependente (Kuan et al., 2012).

Além dos macrófagos, o efeito citotóxico dos monômeros resinosos tem sido avaliado em diferentes tipos celulares. Em culturas de fibroblastos gengivais de humanos os monômeros Bis-GMA, TEGDMA, UDMA e HEMA apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos por causarem rupturas da cadeia dupla de DNA (Urcan et al., 2010). Em células de ovário de hamster, os monômeros UDMA e TEGDMA ocasionaram alteração do ciclo celular e induziram a morte celular programada - apoptose (Wisniewska-Jarosinska et al., 2011). Entretanto, a avaliação de monômeros não reproduz, de fato, o modo de utilização desses materiais rotineiramente na clínica, que consiste na sua forma polimerizada, ou seja, na forma de resina composta.

Nesse sentido, há poucos estudos que enfoquem os efeitos biológicos, tais como citotoxicidade e capacidade pró-inflamatória das resinas compostas KaloreTM (Tadin et al., 2013) e Silorane (Kostoryz et al., 2001; Schweikl et al., 2005; Brackett et al., 2007; Ruiz-de-Castañeda et al., 2011, 2013). Recentemente, possíveis alterações no DNA de células epiteliais de humanos foram reportadas após a exposição à resina KaloreTM inserida em restaurações Classe V (Tadin et al., 2013).

In vivo, a compatibilidade tecidual do sistema resinoso à base de silorane (Filtek™ Silorane) foi comparada a uma resina à base de metacrilato (Filtek™ Supreme XT), após a implantação no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos e os autores observaram que ambas apresentaram resposta tecidual semelhante a do controle – tubo de polietileno vazio (Ruiz-de-Castañeda et al., 2011). De maneira semelhante, as respostas pulpar e periapical, foram satisfatórias 10 e 90 dias após restauração de cavidades profundas de Classe V em dentes de cães (Ruiz-de-Castañeda et al., 2013).

O potencial mutagênico de diferentes moléculas de silorane e oxirane foi avaliado previamente em cultura de fibroblastos de hamster V79B e foram observados diferentes graus de atividade mutagênica quando as células foram expostas ao oxiranes, entretanto, as moléculas de silorane não induziram mutação genética (Schweikl et al., 2004). Ainda, verificaram que a resina à base de silorane Hermes III (3M ESPE), ao contrário de outras resinas à base de metacrilato - Tetric Ceram (Ivoclar Vivadent) e Solitaire 2 (Heraeus-Kulzer) - não se apresentou tóxica em cultura de células da polpa humana (Krifka et al. 2012). Entretanto, o efeito deste material em outros tipos celulares foi pouco investigado.

Dessa maneira, acreditamos que sejam necessários estudos experimentais, com o objetivo de avaliar o comportamento destas novas resinas compostas sobre outros tipos celulares como células inflamatórias e células residentes do tecido conjuntivo pulpar.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento citotóxico e a produção de citocinas induzidos pelos materiais restauradores Kalore™ (GC FUJI) e Filtek™ Silorane (3M ESPE) em comparação com os materiais convencionais Charisma® (Heraeus-Kulzer) e Filtek™ Z250 (3M ESPE) em cultura de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 de camundongos.

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

Resinas compostas fotopolimerizáveis

As resinas compostas utilizadas para estimular as culturas de células foram: Kalore™ (GC FUJI, Kasugai, Japão); Filtek™ Silorane (3M ESPE, Seefeld, Alemanha); Charisma® (Heraeus-Kulzer, Wehrhein, Alemanha) e Filtek™Z250, (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA); disponíveis comercialmente em bisnagas contendo 4g (Figura 1). A composição das resinas compostas fotopolimerizáveis está descrita na Tabela 1.



Figura 1 - **A)** Resina composta Kalore™ (GC FUJI); **B)** Resina composta Filtek™ Silorane (3M ESPE); **C)** Resina composta Charisma® (Heraeus-Kulzer); **D)** Filtek™Z250 (3M ESPE).

Tabela 1 - Composição das resinas compostas Kalore™, Filtek™ Silorane, Charisma® e Filtek™Z250, de acordo com as informações dos fabricantes

Resina Composta	Fabricante/Cor	Partícula	Matriz Orgânica	Carga Inorgânica (C.I.)	% C.I.
Kalore™	GC FUJI/ A3	Nanohíbrida	DX-511 UDMA Comonômeros de dimetacrilato inespecíficos	Fluoroaminosilicato de vidro (carga pré-polimerizada de sílica e Dióxido de silício)	82
Filtek™ Silorane	3M ESPE/ A3	Microhíbrida	Siloxane Oxirane	Quartzo Fluoreto de Ítrio	76
Charisma®	Heraeus-Kulzer/ A3	Microhíbrida	BisGMA/TEGDMA	Flúor/Bário/Silício Sílica dispersa	78
Filtek™Z250	3M ESPE/ A3	Microhíbrida	BisGMA/ BisEMA/UDMA	Vidro de zircônia Sílica	84

Grupos experimentais

A viabilidade celular e a produção de citocinas foram avaliadas após a exposição das células às resinas compostas descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Grupos experimentais de acordo com o material utilizado e fotopolimerização

Grupos	Material
Kf	Resina Composta Fotopolimerizada: Kalore™
Sf	Resina Composta Fotopolimerizada: Filtek™ Silorane
Cf	Resina composta Fotopolimerizada: Charisma®
Zf	Resina Composta Fotopolimerizada: Filtek™ Z250
K	Resina Composta não Fotopolimerizada: Kalore™
S	Resina Composta não Fotopolimerizada: Filtek™ Silorane
C	Resina Composta não Fotopolimerizada: Charisma®
Z	Resina Composta não Fotopolimerizada: Filtek™ Z250

Como controle positivo, as células foram expostas ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) de *Escherichia coli* (Lipopolisaccharide B *E.coli* 0111:B4 – Product number L4130 – Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) na concentração de 10ng/ml (LPS 10) e 100ng/ml (LPS 100) e como controle negativo, foram incubadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) incompleto (DMEM-i).

Preparo das amostras

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas da International Organization for Standardization (ISO) nº 10993-5: 2009.

Pesagem da resina composta

Na ausência de luz artificial, para evitar a fotopolimerização, as resinas compostas foram removidas das bisnagas com uma espátula esterilizada para resina número 1, colocada sobre grau cirúrgico esterilizado e pesada em balança de precisão (PG 503-S, Mettler Toledo®, Toledo, Ohio, EUA).

Concentrações utilizadas

Diferentes concentrações das resinas compostas foram utilizadas no intuito de verificar a citotoxicidade e capacidade de estimular a produção de citocinas. Sendo assim, as concentrações utilizadas foram: 80mg/ml, 40mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml.

Obtenção da resina composta fotopolimerizada

Em seguida, alguns grupos foram fotopolimerizados a partir de dispositivo de luz LED (*Light-emitting diode* – diodo emissor de luz, RADII-CAL SDI, Austrália) com intensidade de luz 1200 mW/cm², no comprimento de onda 430-480nm. O tempo de fotopolimerização utilizado para as resinas compostas foi, de acordo com as instruções do fabricante, de 20 segundos para cada incremento de resina composta (aproximadamente 20 mg).

Para o grupo não fotopolimerizado, as resinas foram mantidas ao abrigo da luz até o momento de utilização.

Preparo da cultura de células

Estudo em cultura de fibroblastos L929 - Avaliação da produção de citocinas

Os fibroblastos são as células predominantemente encontradas no tecido conjuntivo frouxo (Katchburian e Arana, 2004) e são importantes nas fases de reparação e remodelação tecidual (Pan et al., 2006). Estas células são importantes para a produção dos componentes da matriz extracelular (Baxter et al., 2002).

Para esse estudo, foi utilizada a linhagem de fibroblasto L929 de camundongos, previamente obtida da Coleção Americana de cultura de células (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio DMEM suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro fetal bovino (SBF; Gibco, Carlsbad, CA, EUA).

Inicialmente as células foram descongeladas, sendo o conteúdo do tubo criogênico transferido para um tubo Falcon contendo 10 ml do meio de cultura DMEM-c, suplementado com 10% SBF e solução antibiótica de Gentamicina 10 mg/mL (Gibco, EUA) (Tabela 3). O conteúdo foi centrifugado a 1.500 rpm (rotações por minuto), por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 30 ml de meio DMEM-c. Para os ensaios de estimulação *in vitro* as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em frascos de cultura celular de 750 cm², mantidas em incubadora com controle de temperatura e pressão em ambiente úmido a 37°C, em fluxo de 95% de ar e 5% de CO₂.

Após as células atingirem confluência, o meio DMEM-c das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 30 ml de solução de salina fosfatada tamponada (PBS), a fim de remover debris e células mortas. Em seguida, foram adicionados 30 ml de DMEM-c e as células que permaneceram nas superfícies dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com rodos esterilizados (Cell Scraper,

Corning Glass Workers, NY, EUA). O meio contendo as células foi então retirado e pipetado em tubo falcon esterilizado de 50 ml. O frasco foi centrifugado, a 1.500 rpm, durante 10 minutos, para separação das células do meio. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10ml de DMEM-c foi adicionado ao tubo contendo o *pellet*.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer (BOECO Germany, Hamburg, Alemanha) partindo-se da suspensão de 100µl diluída 10 vezes em solução de azul de Trypan (Gibco, NY, EUA) para a contagem total do número de células viáveis. As células foram então transferidas para placas de cultura de 96 poços (Cell Wells, 25820, Corning Glass Workers, NY, EUA), na densidade de 1×10^5 células/poço e incubadas *overnight* em DMEM-c a 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂.

Em seguida, as placas foram lavadas com PBS, os estímulos adicionados, e as células incubadas em estufa 37°C, 5% CO₂ por 6, 12 e 24 horas. Assim, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20°C até o momento da quantificação de citocinas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA).

Tabela 3 - Composição do meio de cultura DMEM-c para manutenção celular

Solução DMEM Concentrada	Proporção
DMEM pó (cat. 12100-038) (Gibco)	13,4g
NAHCO ₃ (bicarbonato de sódio) (Sigma)	3,7g
Água Milli Q	1L
Gentamicina 10 mg/mL (Gibco)	1:1.000
Soro Bovino Fetal	10%

Estudo em cultura de macrófagos RAW 264.7 - Avaliação da viabilidade celular e da produção de citocinas

Os macrófagos, células inflamatórias, têm sua atividade relacionada às respostas inflamatórias inespecíficas, bem como aos quadros específicos envolvendo resposta imunológica com ativação dos linfócitos. Ainda, apresentam fundamental importância para a reparação tecidual e produção de citocinas, tais como TNF- α e IL-1 α (Metzger, 2000; Katchburian e Arana, 2004).

Para esse estudo, foi utilizada linhagem de macrófagos RAW 264.7 de camundongos, previamente obtida da Coleção Americana de cultura de células (ATCC). As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio DMEM suplementado com 10% de DMSO e 90% de SBF. Para os ensaios de estimulação *in vitro* as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas

em frascos de cultura celular de 750 cm² (Corning Glass Workers , NY, EUA) em meio DMEM-c, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Assim, ocorreu a proliferação dos macrófagos que, progressivamente, colonizaram a superfície das garrafas, formando uma monocamada celular contínua.

As células foram então transferidas para placas de cultura de 96 poços (Cell Wells, 25820, Corning Glass Workers), na densidade de 1x10⁵ células/poço e incubadas overnight em DMEM-c a 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂.

Em seguida, as placas foram lavadas com PBS, os estímulos adicionados, e as células incubadas em estufa 37°C, 5% CO₂ por 6, 12 e 24 horas. Assim, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20°C até o momento da quantificação de citocinas por ELISA.

Experimento

Teste de Contato Indireto

Inicialmente, as resinas compostas testadas foram removidas da bisnaga, pesadas, fotopolimerizadas ou não, e inseridas diretamente nos poços, sem a realização da incubação prévia em meio de cultura. Entretanto, para que essas resinas compostas não entrassem em contato direto com as células plaqueadas e aderidas no fundo do poço da placa de cultura em meio DMEM incompleto (DMEM-i) – meio de cultura sem suplementação de SBF – foram utilizados insertos com membranas (ou câmaras transmembrânicas), também conhecidos como suportes permeáveis Transwell® (Corning Incorporated, Corning, NY).

Teste de Extração

As resinas compostas testadas, nesta etapa, foram removidas da bisnaga, pesadas, fotopolimerizadas ou não, submetidas a um processo de desinfecção e, em seguida, incubadas em meio de DMEM-i durante 15, 45 e 120 dias. Assim, para a realização do experimento, o meio de cultura contendo o extrato da resina composta foi utilizado para avaliar a citotoxicidade e a produção de citocinas. Nesse caso, não houve necessidade da utilização de inserto quando da colocação do estímulo na cultura de células, pois a resina composta utilizada não era colocada diretamente sobre as células.

A desinfecção das resinas compostas foi feita previamente à incubação das mesmas em meio DMEM-i. Para tanto, foi preparado meio de cultura 10x mais concentrado com antibiótico, que continha 500µl de Gentamicina (Gibco, EUA) e 5ml de Penicilina (Gibco, EUA) e Estreptomicina (Gibco, EUA). Em seguida, as resinas compostas foram colocadas em

placas de 12 poços devidamente identificadas e adicionados 3ml do meio, de modo que o material ficasse totalmente recoberto por essa solução durante 30 minutos. Em seguida, a solução foi removida com auxílio de pipeta sorológica e cada poço da placa lavado com 3 ml de PBS e adicionados, então, 3ml/poço de meio DMEM-i. A resina composta e o meio DMEM-i foram incubados à temperatura de 37°C, em estufa umidificada contendo 5% de CO₂.

Viabilidade celular – Ensaio MTT

Uma suspensão de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi ajustada para 1×10^5 células/poço em 200µL de meio de cultura DMEM-c com 10% de SBF adicionado de antibiótico. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C, 5% CO₂ *overnight* para a adesão. Após este período, foi adicionado 100 µl de meio DMEM-i incubado com as resinas compostas fotopolimerizadas e não fotopolimerizadas incubadas por 15, 45 ou 120 dias. Após, estas foram incubadas por 6, 12 e 24 horas e o meio de cultura substituído por RPMI (*Roswell Park Memorial Institut*) incolor (RPMI-I, cat. 11835030, 500ml) (Gibco, EUA) contendo o corante MTT - Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio a 0,5mg/mL (Ensaio Colorimétrico MTT Sigma M-5655) (Mosmann, 1983), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, as quais são ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983). Assim, as células foram incubadas nas mesmas condições por 3 horas. Após esse período, foi adicionado 50µL de SDS (*Dodecil sulfato de sódio*) 20% em 0,01N de HCl em cada poço e mantido a temperatura ambiente para a solubilização completa do precipitado formado, para a posterior realização da medida colorimétrica, em espectrofotômetro. A absorbância referente a cada poço foi determinada no comprimento de onda de 570nm (µQuant, Bio-tek Instruments, Inc., Winooski, VT). A viabilidade celular nos grupos Kf, Sf, Cf, Zf, K, S, C e Z foi expressa em porcentagem e comparada ao controle.

Produção de citocinas induzida por resinas compostas - Dosagem por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para o ELISA para detecção das citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10, 100 µl da solução contendo o anticorpo de captura diluído em 11 ml de PBS 1x, foram pipetados em cada poço das placas de 96 poços. Assim, as placas foram recobertas com papel filme e incubadas *overnight*. Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e o conteúdo descartado na pia. Em seguida, as placas foram lavadas em PBS 1x. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com tampão bloqueio, diluído em água livre de pirogênio (Milli-Q® Ultrapure Water Purification, Millipore Corporate Headquarters, Billerica, EUA) incubando-se por 1 hora em

temperatura ambiente. Para construção da curva-padrão foram utilizadas citocinas recombinantes obtidas comercialmente (TNF- α , IL-6 ou IL-10). Após a adição das amostras e do padrão, as placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente, e em seguida, lavadas. A detecção de citocinas foi realizada utilizando-se anticorpo de detecção anti-citocinas diluído em 11,5 mL de tampão bloqueio. As placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após as lavagens, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos com StreptAB kitTM (R & D Systems, MN, EUA) – enzima estreptoavidina na proporção 1:200 em tampão bloqueio. Após as lavagens das placas, 100 μ l do revelador foi adicionado (TMB reagente set) em cada poço em ambiente escuro. A reação foi finalizada pela adição de 50 μ l de uma solução de ácido sulfúrico 1N. Foram utilizados anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e proteínas recombinantes, de acordo com instruções do fabricante (R & D Systems).

As concentrações das citocinas foram determinadas em comparação às curvas-padrão obtidas de valores conhecidos de TNF- α , IL-6 e IL-10 recombinantes de camundongos. A leitura das densidades óptica (DO) foi determinada por meio da utilização de leitor de ELISA (μ Quantil, Bio-tek Instruments, Inc) em comprimento de onda de 450nm. O ensaio foi realizado em duplicata e os resultados expressos em pg/ml.

Análise estatística

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA), utilizando o teste paramétrico análise de variância de uma via (One-way ANOVA) e o pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

4 RESULTADOS

Teste de Contato Indireto – Ensaio de citocinas (TNF- α e IL-6)

Avaliação da expressão de TNF- α e IL-6 em cultura de fibroblastos L929

Inicialmente avaliou-se a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 por fibroblastos L929 de camundongos, cultivados em meio contendo diferentes resinas compostas fotopolimerizáveis.

Observou-se, nesse estudo piloto, que os fibroblastos (L929) não produziram TNF- α em níveis detectáveis após 6, 12 e 24 horas da colocação dos estímulos em contato indireto com as células.

Avaliação da expressão de TNF- α e IL-6 em cultura de macrófagos RAW 264.7

Produção de TNF- α

Os grupos Kf, K e S não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6, 12, e 24 horas de incubação ($p > 0,05$). Entretanto, o grupo Sf apresentou menor produção de TNF- α em relação ao grupo controle após 12 horas de incubação ($p < 0,05$). Nos períodos de 6 e 24 horas, o grupo Sf não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p > 0,05$).

Os grupos Kf e K não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, bem como os grupos Sf e S não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$) (Figura 1).

O LPS foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 10ng/ml ou 100ng/ml. Os grupos LPS 10 e LPS 100 apresentaram maior produção de TNF- α em relação ao controle após 6, 12 e 24 horas de incubação ($p < 0,05$) (Figura 1).

Produção de IL-6

Não houve produção detectável de IL-6 após estímulo com as resinas compostas Kalore™ ou Filtek™ Silorane, fotopolimerizadas ou não, nos períodos avaliados.

Os grupos LPS 10 e LPS 100 apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, aumentando a produção de IL-6 após 6, 12 e 24 horas (Figura 1).

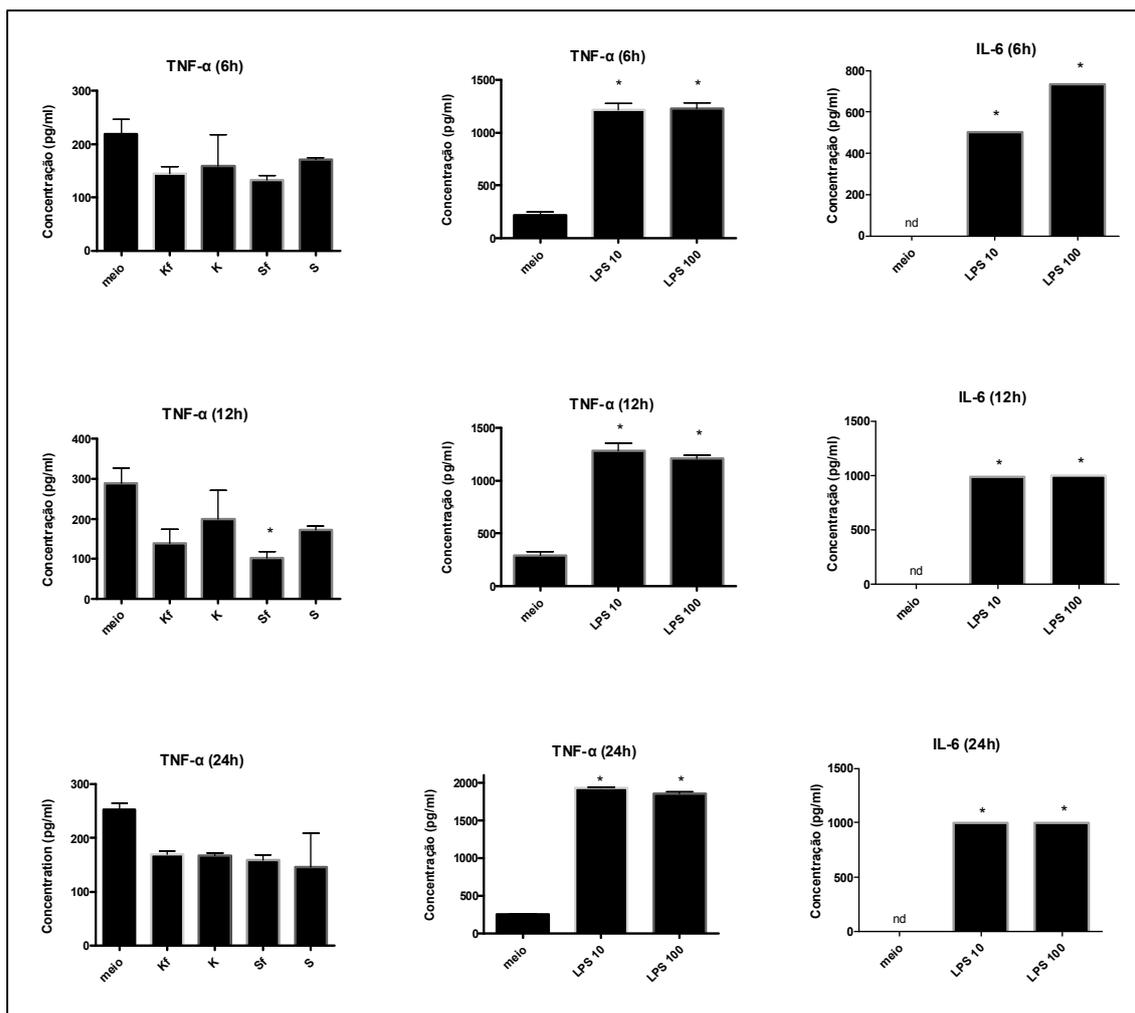


Figura 1 - Efeito das diferentes resinas compostas fotopolimerizáveis (Kalore™ fotopolimerizada – Kf, Kalore™ – K, Filtek™ Silorane fotopolimerizada – Sf, Filtek™ Silorane – S) na liberação de TNF-α e IL-6, em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, por meio do Ensaio ELISA. Diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*. Concentrações não detectadas de citocinas foram identificadas por meio de "nd". LPS 10 e LPS 100 correspondem a LPS na concentração de 10ng/ml e 100ng/ml, respectivamente.

Teste de Extração – Avaliação da Citotoxicidade

Tendo em vista que a linhagem de fibroblastos não respondeu aos estímulos utilizados, nos experimentos seguintes foram utilizados macrófagos da linhagem RAW 264.7. Nestes experimentos, além das resinas compostas Kalore™ e Filtek™ Silorane foram incluídas no estudo as resinas convencionais Charisma® e Filtek™ Z250 para efeito de comparação.

Foram avaliadas a citotoxicidade e a produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-6) bem como da expressão de uma citocina anti-inflamatória (IL-10), após estímulo das células com as resinas compostas fotopolimerizáveis e da exposição ao LPS (estímulo pró-inflamatório). Nestes experimentos foram utilizadas diversas

concentrações das resinas compostas, a fim de definir a concentração ideal para estimular a produção de citocinas. As concentrações utilizadas foram: 80mg/ml, 40mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml e 5mg/ml.

Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 15 dias de extração das resinas Kalore™ e Filtek™ Silorane

Considerando que as resinas compostas podem apresentar efeito citotóxico, por contato direto ou indireto (Hanks et al., 1991; Geurtsen et al., 1998; Wataha et al., 1999; Bouillaguet et al., 2000; Geurtsen, 2000; Kleinsasser et al., 2004; Schweikl et al., 2005; Becher et al., 2006; Kleinsasser et al., 2006; Goldberg, 2008; Wisniewska-Jarosinska et al., 2011; Kuan et al., 2012), em diversos tipos celulares, foi investigada a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT.

Os resultados de viabilidade celular mostraram que as resinas Kf e K em todas as concentrações não apresentaram citotoxicidade em cultura de macrófagos, sendo essas semelhantes estatisticamente ao controle ($p > 0,05$), nos períodos de 6 e 12 horas. Entretanto, as resinas Kf e K em todas as concentrações utilizadas apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação controle, reduzindo a viabilidade celular, em torno de 20% no período de 24 horas ($p < 0,05$) (Figura 2).

Os resultados obtidos demonstraram que a resina Sf nas concentrações 80, 40 e 20 não apresentaram citotoxicidade, sendo semelhantes estatisticamente ao controle ($p > 0,05$), nos períodos de 6, 12 e 24 horas. Entretanto, a resina S, em todas as concentrações utilizadas, apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, diminuindo a viabilidade celular em torno de 20% e 40%, nos períodos de 12 e 24 horas, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 2).

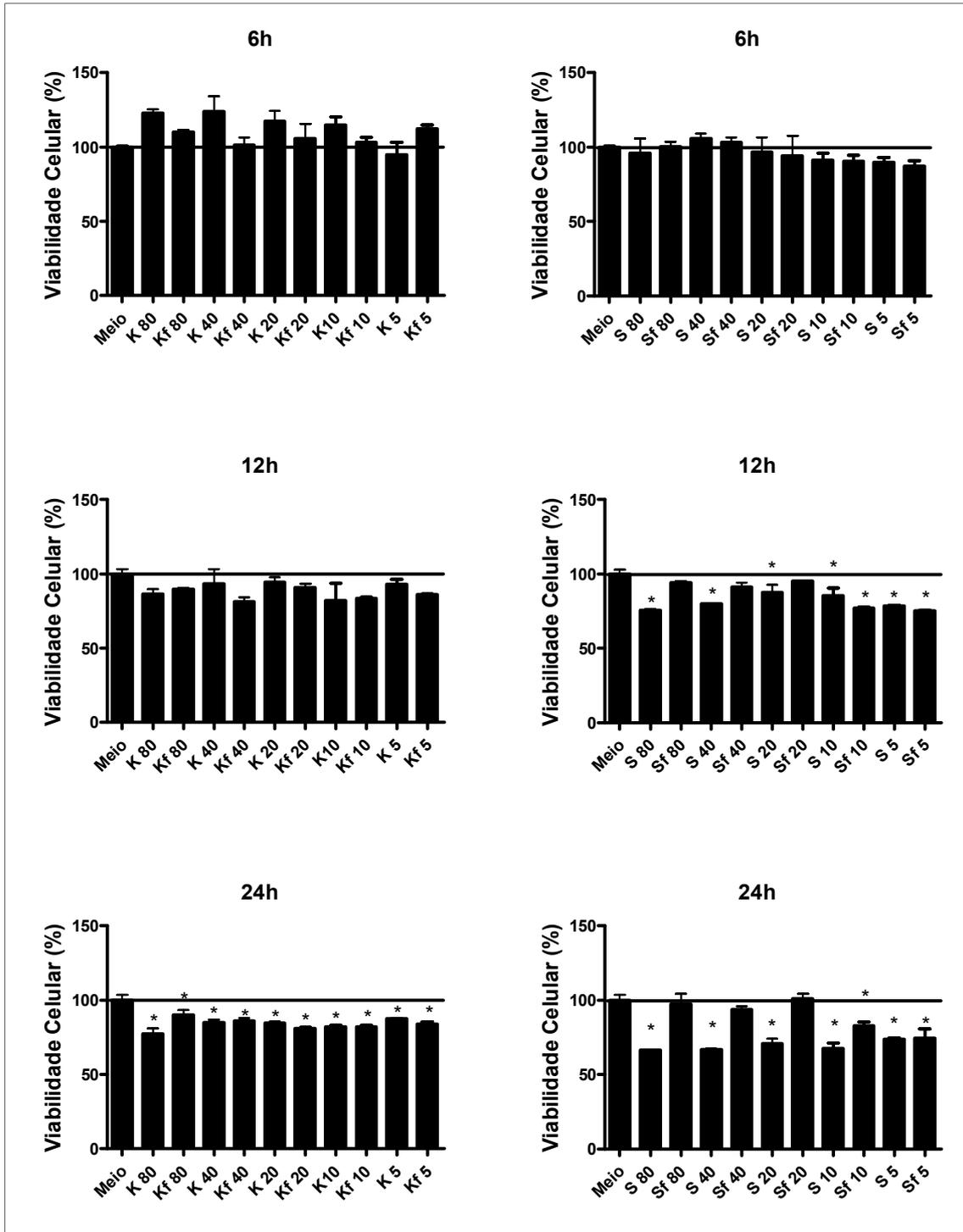


Figura 2 - Efeito das diferentes concentrações das resinas (Kalore™ fotopolimerizada – Kf, Kalore™ – K, Filtek™ Silorane fotopolimerizada – Sf, Filtek™ Silorane – S) em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos por meio do Ensaio de MTT, após 15 dias de extração. Diferenças estatisticamente significantes em relação a grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 15 dias de extração com as resinas Charisma® e Filtek™ Z250

Os resultados obtidos demonstraram que as resinas Cf e C apresentaram citotoxicidade, diminuindo a viabilidade celular, em torno de 20%, no período de 6 horas ($p < 0,05$) (Figura 3). Nos períodos de 12 e 24 horas as resinas não apresentaram citotoxicidade estatisticamente diferente do controle ($p > 0,05$).

As resinas compostas Zf e Z não se apresentaram tóxicas à cultura de células, sendo essas semelhantes estatisticamente ao controle, nos períodos de 6, 12 e 24 horas ($p > 0,05$) (Figura 3).

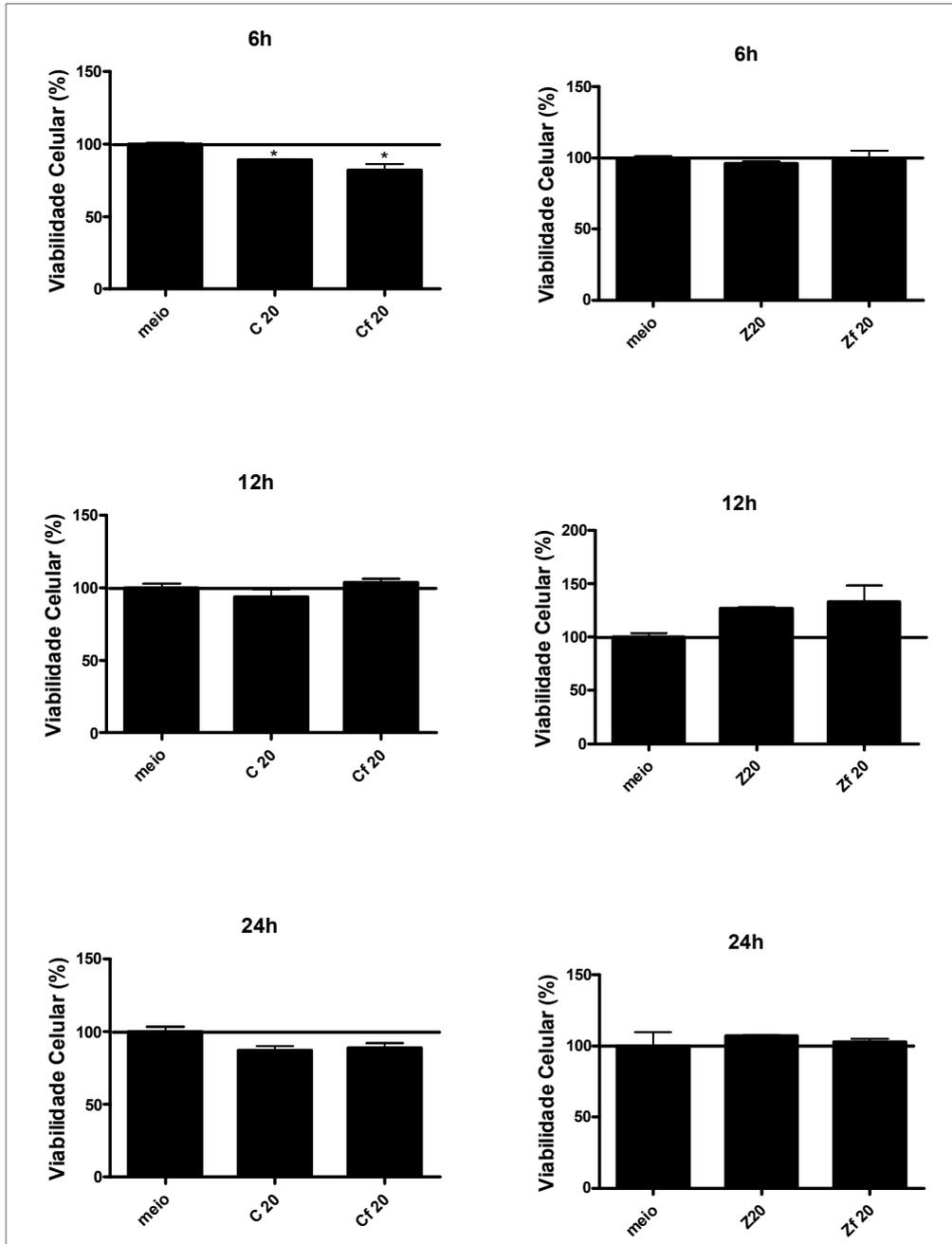


Figura 3 - Efeito das resinas compostas fotopolimerizáveis (Charisma[®] fotopolimerizada – Cf, Charisma[®] – C, Filtek[™] Z250 fotopolimerizada, Filtek[™] Z250 – Z) em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos por meio do Ensaio de MTT, após 15 dias de extração. Diferenças estatisticamente significantes em relação a grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 45 dias de extração com a resina Kalore™, Filtek™ Silorane e Filtek™ Z250

Após a padronização da concentração, os experimentos seguintes foram realizados com a concentração de 20mg/ml de resina composta fotopolimerizável. Como não houve diferença na citotoxicidade induzida pelas resinas compostas convencionais Charisma® e Filtek™ Z250 após o período mínimo de 24 horas de incubação recomendado pela ISO 10993-5, os experimentos seguintes foram realizados comparando-se as resinas Kalore™ e Filtek™ Silorane com a resina Filtek™ Z250.

Os resultados de viabilidade celular obtidos mostraram que as resinas compostas Kf, K, Zf, Z não se apresentaram tóxicas à cultura de células, sendo essas semelhantes estatisticamente ao controle, no período de 6, 12 e 24 horas. Por outro lado, os grupos Sf e S apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, nos períodos de 6 e 24 horas, apresentando diminuição na viabilidade das células, em torno de 20% ($p < 0,05$) (Figura 4).

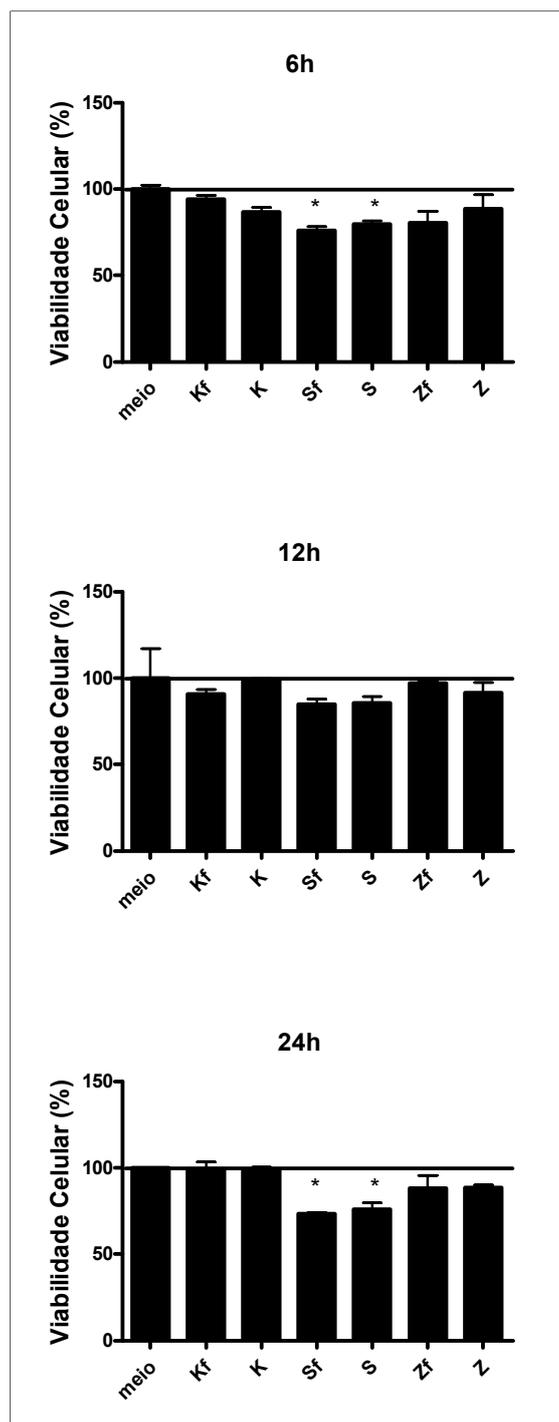


Figura 4 - Efeito das resinas compostas (Kalore™ fotopolimerizada – Kf, Kalore™ – K, Filtek™ Silorane fotopolimerizada – Sf, Filtek™ Silorane – S, Filtek™ Z250 fotopolimerizada – Zf, Filtek™ Z250 – Z) em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos por meio do Ensaio de MTT, após 45 dias de extração. Diferenças significantes em relação ao grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 120 dias de extração com a resina Kalore™, Filtek™ Silorane e Filtek™ Z250

Os resultados obtidos mostraram que, nos períodos das 6, 12 e 24 horas, os materiais não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). Dessa forma, pode-se inferir que os materiais não se apresentaram tóxicos à cultura de células, como observado pelo Ensaio de MTT (Figura 5).

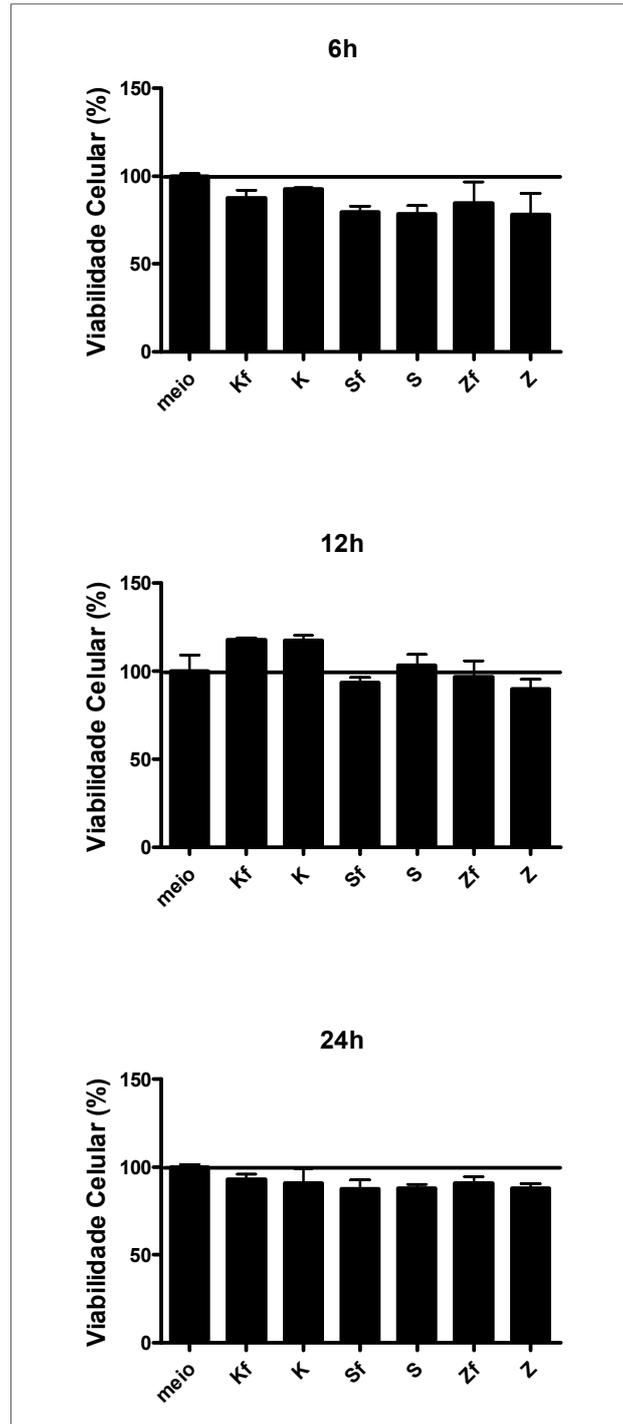


Figura 5 - Efeito das resinas compostas (Kalore™ fotopolimerizada - Kf, Kalore™ - K, Filtek™ Silorane fotopolimerizada - Sf, Filtek™ Silorane - S, Filtek™ Z250 fotopolimerizada - Zf, Filtek™ Z250 - Z) em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos por meio do Ensaio de MTT, após 120 dias de extração. Não foram observadas diferenças significantes em relação ao grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura).

Teste de Extração – Ensaio de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10)

Avaliação da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-10 por macrófagos RAW 264.7, após 15 dias de extração com a resina Kalore™

Produção de TNF- α

Como demonstrado na Figura 6, o estímulo das células com as resinas K 80, K 40, K 20, K 10, Kf 80, Kf 10, Kf 5 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, aumentando a produção de TNF- α após 6 horas de incubação ($p < 0,05$). O grupo K 80 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, aumentando a produção de TNF- α após 12 horas de incubação ($p < 0,05$). Os grupos K 80, K 40 apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, aumentando a produção de TNF- α após 24 horas de incubação, enquanto o grupo Kf 20 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, diminuindo a produção de TNF- α após 24 horas de incubação ($p < 0,05$).

No período de 6 horas, os grupos Kf 80 e K 80, Kf 40 e K 40, Kf 20 e K 20, Kf 10 e K 10 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p < 0,05$), de modo que os grupos fotopolimerizados inibiram a produção de TNF- α em relação aos grupos não fotopolimerizados.

Produção de IL-6

Não houve produção detectável de IL-6 após estímulo com Kf ou K, nas diferentes concentrações, nos períodos avaliados.

Produção de IL-10

Após a análise estatística, pode-se inferir que os grupos K 20 e Kf 5 apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 12 horas de incubação ($p < 0,05$), estimulando a produção de IL-10. Nos períodos das 6 e 24 horas os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p > 0,05$) (Figura 6).

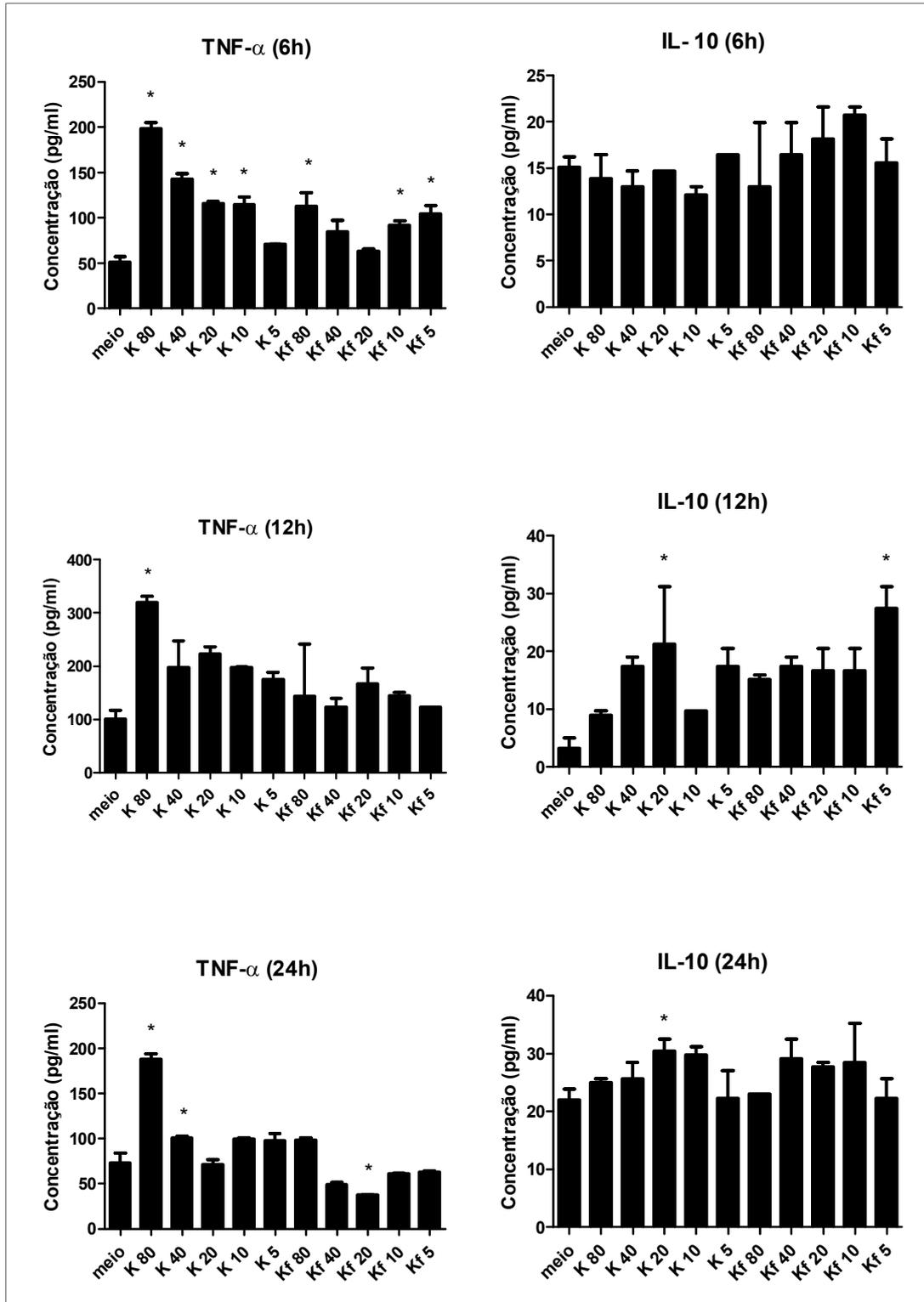


Figura 6 - Efeito das diferentes concentrações das resinas compostas fotopolimerizáveis (Kalore™ fotopolimerizada – Kf, Kalore™ – K) na liberação de TNF- α e IL-10 em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, por meio de ELISA, após 15 dias de extração. Diferenças estatisticamente significantes em relação a grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Avaliação da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-10 por macrófagos RAW 264.7, após 15 dias de extração com a resina Filtek™ Silorane

Produção de TNF- α

Como demonstrado na Figura 7, o estímulo das células com os materiais dos grupos S e Sf não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6 e 12 horas de incubação ($p > 0,05$). Entretanto, o estímulo das células com as resinas S 80, S 40, S 20, S 10, S 5, Sf 40, Sf 20 e Sf 5 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, diminuindo a produção de TNF- α após 24 horas de incubação ($p < 0,05$).

Produção de IL-6

Não houve produção detectável de IL-6 após estímulo com Sf ou S, nas diferentes concentrações, nos períodos avaliados.

Produção de IL-10

Os grupos Sf e S não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6, 12 e 24 horas de incubação ($p > 0,05$).

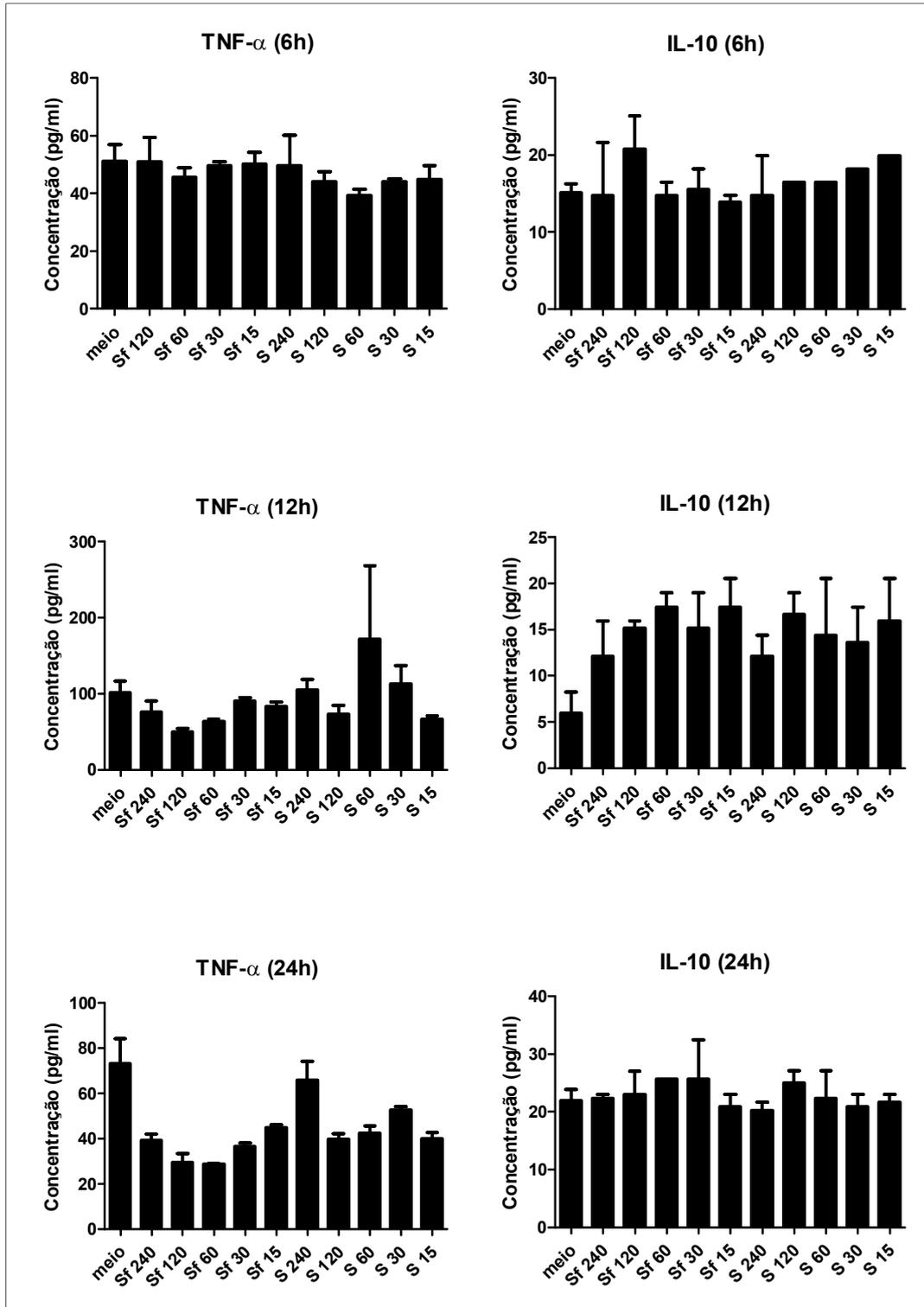


Figura 7- Efeito das diferentes concentrações da resina composta fotopolimerizável (Filtek™ Solorane fotopolimerizada - Sf, Filtek™ Solorane – S) na liberação de TNF- α e IL-10 em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, por meio de ELISA, após 15 dias de extração. Diferenças estatisticamente significantes em relação a grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Avaliação da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-10 em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 15 dias de extração com a resina Charisma[®]

Produção de TNF- α

Como demonstrado na Figura 8, o estímulo das células dos grupos C 20 e Cf 20 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6, 12 e 24 horas de incubação, diminuindo a produção de TNF- α ($p < 0,05$).

Produção de IL-6

Não houve produção detectável de IL-6 após estímulo com Cf ou C nos períodos avaliados.

Produção de IL-10

Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6, 12 e 24 horas de incubação, produzindo IL-10 em concentrações semelhantes ($p > 0,05$).

A Figura 8 apresenta os resultados da liberação de TNF- α e IL-10 para a resina Charisma[®] na concentração de 20 mg/ml.

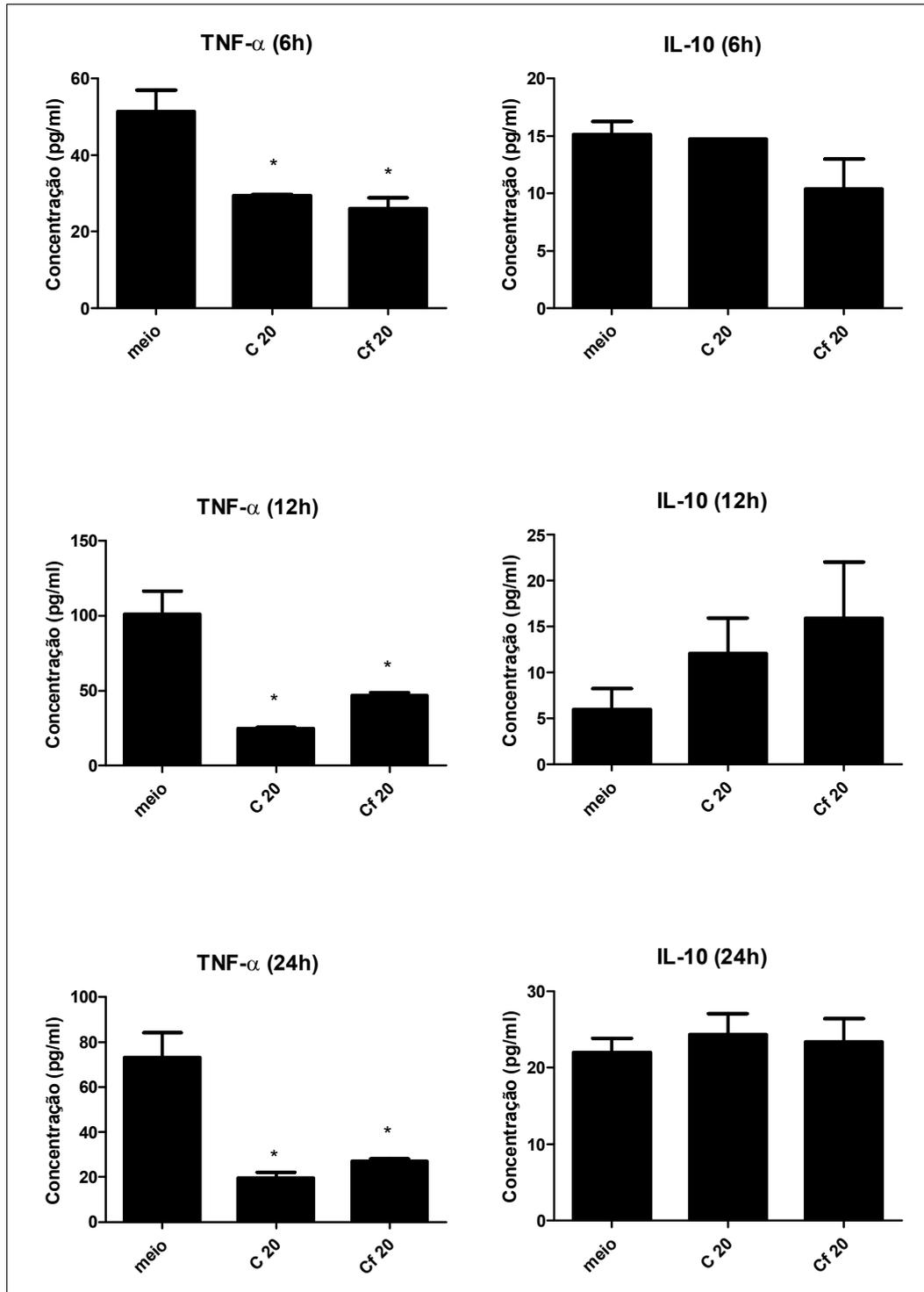


Figura 8- Efeito da resina composta fotopolimerizável (Charisma[®] fotopolimerizada - Cf, Charisma[®] - C) na liberação de TNF- α e IL-10 em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, por meio de ELISA, após 15 dias de extração. Diferenças estatisticamente significantes em relação a grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Avaliação e da expressão de TNF- α e IL-6 em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 15 dias de extração com a resina Filtek™ Z250

Produção de TNF- α

Os grupos Zf e Z não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6, 12 e 24 horas de incubação ($p > 0,05$).

Produção de IL-6

Não houve produção detectável de IL-6 após estímulo com Zf e Z nos períodos avaliados.

A Figura 9 apresenta os resultados da liberação de TNF- α para a resina Filtek™ Z250 na concentração de 20 mg/ml.

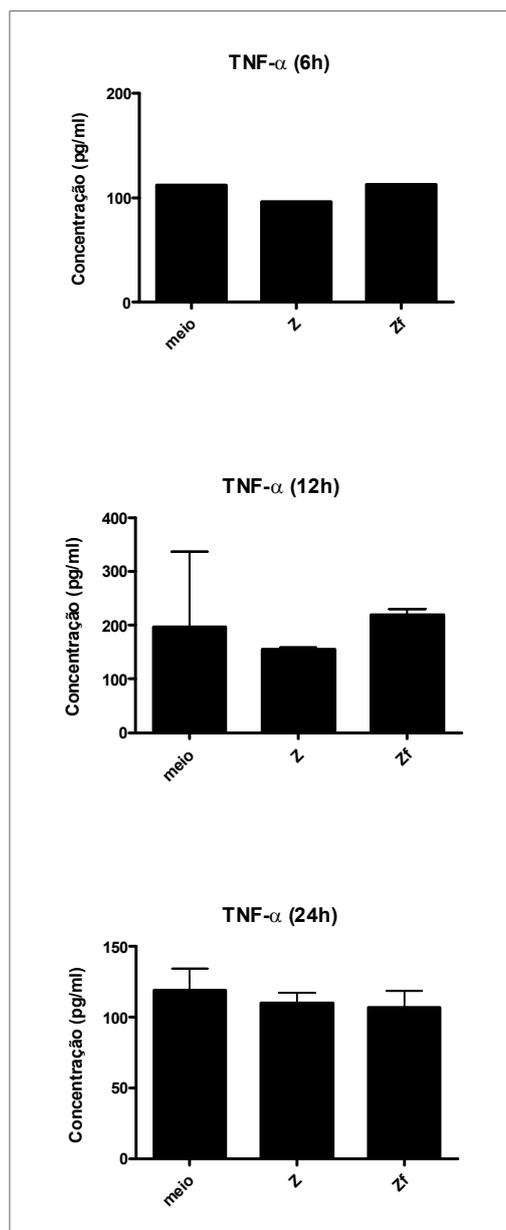


Figura 9 - Efeito da resina composta fotopolimerizável (Filtek™ Z250 fotopolimerizada – Zf, Filtek™ Z250 – Z) na liberação de TNF- α , em culturas de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, por meio de ELISA, após 15 dias de extração. Não foram observadas diferenças significantes em relação ao grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura).

Avaliação da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-10 em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 45 dias de extração com as resinas KaloreTM, FiltekTM Silorane e FiltekTM Z250

Produção de TNF- α

O estímulo dos grupos Kf, K, Sf, S, Zf e Z não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6, 12 e 24 horas de incubação ($p > 0,05$).

Produção de IL-6

Houve aumento na liberação de IL-6 após 6 horas de incubação com o estímulo com Sf e S ($p < 0,05$). Entretanto, ambos os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após 12 e 24 horas de incubação ($p > 0,05$).

Produção de IL-10

O grupo Kf apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 12 horas de incubação, diminuindo a produção de IL-10 ($p < 0,05$). Entretanto, os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6 e 24 horas ($p > 0,05$).

No período de 12 horas, os grupos K e Kf apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, de modo que o grupo fotopolimerizado inibiu a produção de IL-10 em relação ao grupo não fotopolimerizado ($p < 0,05$) (Figura 10).

A Figura 10 apresenta os resultados da liberação de TNF- α , IL-6, IL-10 para as diferentes resinas compostas avaliadas.

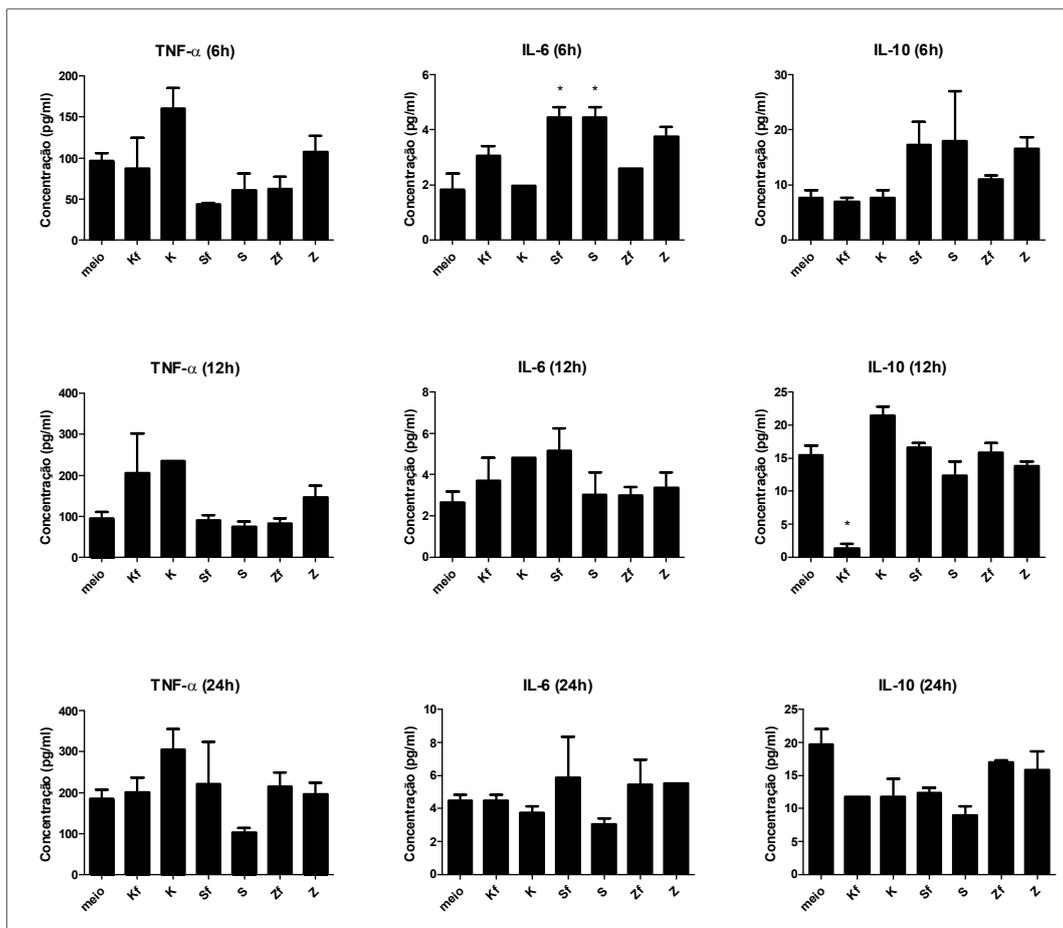


Figura 10 - Efeito das resinas compostas fotopolimerizáveis (KaloreTM fotopolimerizada - Kf, KaloreTM - K, FiltekTM Silorane fotopolimerizada - Sf, FiltekTM Silorane - S, FiltekTM Z250 fotopolimerizada - Zf, FiltekTM Z250 - Z) na liberação de TNF- α , IL-6 e IL-10, em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, por meio de ELISA, após 45 dias de extração. Diferenças estatisticamente significantes em relação a grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Avaliação da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-10 em cultura de macrófagos RAW 264.7, após 120 dias de extração com as resinas KaloreTM, FiltekTM Silorane e FiltekTM Z250

Produção de TNF- α

Os grupos Kf, K, Sf, S, Zf e Z não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6 e 24 horas de incubação ($p > 0,05$). Entretanto, o grupo K apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 12 horas de incubação, aumentando a produção de TNF- α ($p < 0,05$).

Produção de IL-6

Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle após 6, 12 e 24 horas de incubação ($p > 0,05$).

Produção de IL-10

Não houve produção detectável de IL-10 após estímulo com os grupos Kf, K, Sf, S, Zf e Z nos períodos avaliados.

A Figura 11 apresenta os resultados da liberação de TNF- α e IL-6 para as diferentes resinas compostas avaliadas.

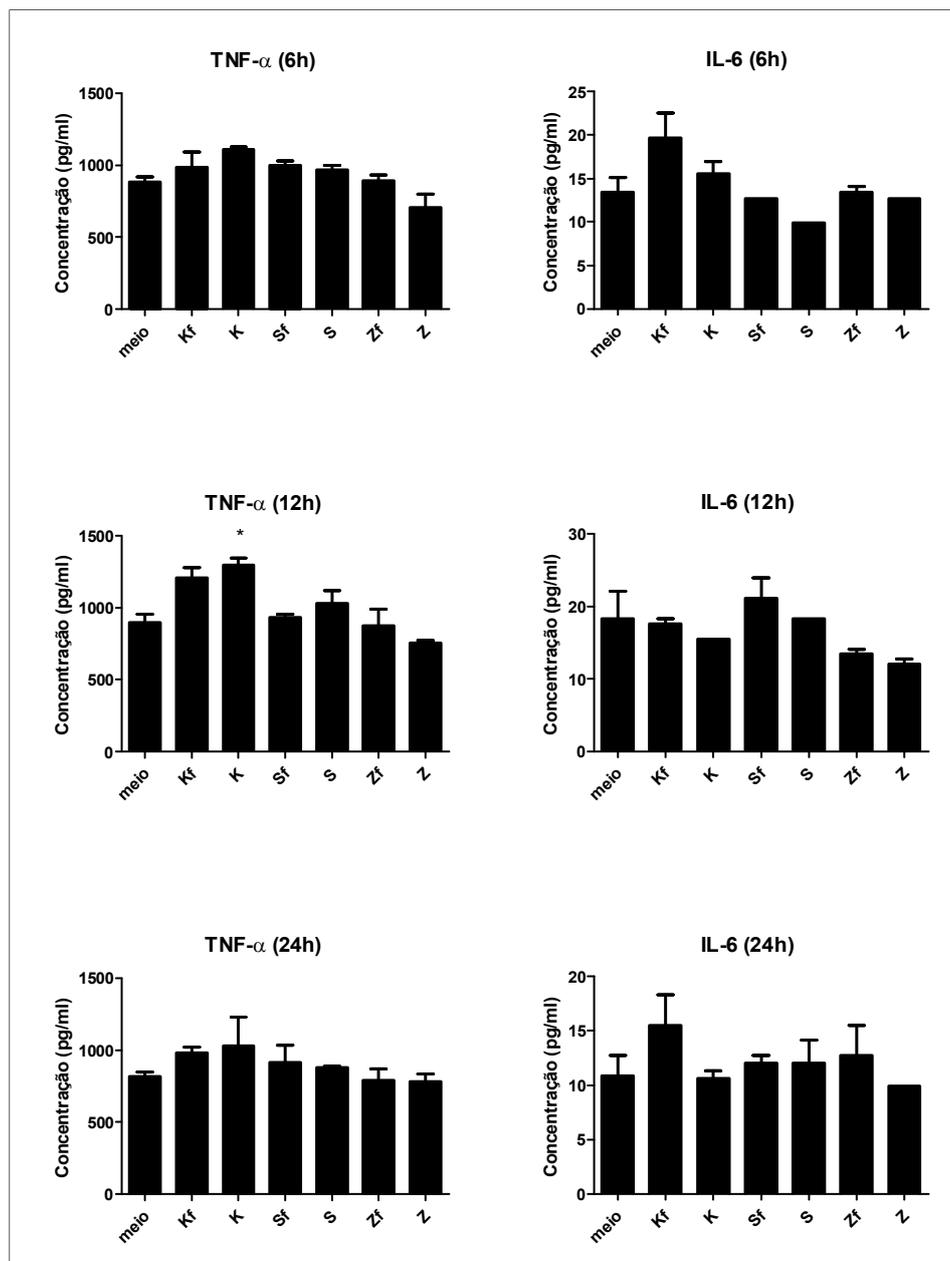


Figura 11 - Efeito das resinas compostas fotopolimerizáveis (Kalore™ fotopolimerizada - Kf, Kalore™ - K, Filtek™ Silorane fotopolimerizada - Sf, Filtek™ Silorane - S, Filtek™ Z250 fotopolimerizada - Zf, Filtek™ Z250 - Z) na liberação de TNF- α e IL-6 em cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, por meio de ELISA, após 120 dias de extração. Diferenças estatisticamente significantes em relação a grupo controle (macrófagos incubados somente em meio de cultura) foram identificadas por meio de*.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O amálgama dental e a resina composta dental são os materiais mais utilizados quando da realização de restaurações diretas em dentes posteriores, em áreas que incidem alta força mastigatória (Burke et al., 2001; Mitchell et al., 2007). No entanto, o uso do amálgama dental, liga que contém prata, mercúrio e estanho, vem sendo gradualmente diminuído na Odontologia Restauradora, devido às demandas estéticas, à preocupação com os riscos provenientes do mercúrio, assim como ao desenvolvimento da Odontologia minimamente invasiva em que o objetivo é a menor remoção possível de tecido mineralizado sadio (Hickel & Manhart, 2001; Burke, 2003; Ricketts & Pitts, 2009; Radz, 2013).

Nesse sentido, as resinas compostas vêm popularizando-se, como material restaurador, no meio odontológico há mais de 40 anos. As restaurações com resinas compostas diretas em cavidades posteriores foram indicadas inicialmente em 1996, e gradativamente vem aumentando em proporção em relação ao amálgama, sendo esses excedidos a partir de 2003 (Rho et al., 2013). Desde o advento das resinas compostas, melhorias nas propriedades mecânicas e químicas vêm ocorrendo visando principalmente a redução na contração de polimerização (Eick et al., 2005; Rodrigues Junior et al., 2008; Naoum et al., 2012). Entretanto, para a aplicação clínica desses materiais, é imprescindível a verificação da compatibilidade biológica dos mesmos, a partir da realização de testes laboratoriais demonstrando a sua não toxicidade (Phillips, 1991; Wataha, 2012).

Em termos gerais, a compatibilidade biológica de uma determinada substância deve ser avaliada em níveis de complexidade, partindo-se dos estudos laboratoriais *in vitro*, experimentos em animais e, por último, testes de uso *in vivo*, principalmente quando essas substâncias mantêm íntimo contato com os tecidos (Wataha, 2012). Nesse sentido, a eleição do modelo experimental, no presente estudo, foi o cultivo celular haja vista a ausência de estudos avaliando os efeitos citotóxicos na resina composta Kalore™.

Segundo as recomendações da ISO 10993-5 (2009), a avaliação da toxicidade de produtos odontológicos pode ser realizada por contato direto, indireto ou pelo método da extração. No contato direto, o material é colocado diretamente em contato com as células, ao passo que no contato indireto o material é colocado em contato com as células por meio da difusão em ágar ou filtros Millipore. Ainda, o teste que utiliza extratos, é realizado a partir da incubação prévia do material em um solvente.

Neste estudo foram utilizados os métodos de contato indireto e de extração, visando simular a situação clínica *in vivo*. Para o método de extração, as resinas compostas foram incubadas em meio de cultura DMEM-incompleto, à temperatura de 37°C, por 15, 45 e 120 dias.

A não utilização, no presente estudo, do método de contato direto para avaliação da citotoxicidade deve-se ao fato de que o contato direto de corpos-de-prova obtidos dos materiais pode causar inibição do crescimento celular decorrente do contato físico e não das substâncias tóxicas liberadas (Vasington et al., 1967). Ainda, as resinas compostas não são indicadas para serem colocadas diretamente sobre o tecido pulpar (Assed, 2005).

Os testes de citotoxicidade são bastante utilizados (de Azevedo et al., 2003; Cavalcanti et al., 2006) visando simular *in vitro* os processos que ocorrem *in vivo*. Apesar de as células cultivadas não sofrerem as mesmas influências fisiológicas que sofreriam no tecido pulpar, por exemplo, este método de avaliação preliminar de toxicidade é recomendado. A resposta de um tipo celular específico a determinados produtos pode ser investigada neste tipo de abordagem experimental (Schmalz, 1994).

Neste estudo foram utilizadas as linhagem de fibroblastos de L929 e de macrófagos RAW 264.7, obtidos de camundongos. A seleção da linhagem de fibroblastos deve-se ao fato dessas células serem as mais abundantes na região central do tecido pulpar (Katchburian e Arana, 2004). Os macrófagos, por outro lado, são células típicas do sistema imune, importantes por desempenharem funções relacionadas à imunidade inata e a produção de mediadores inflamatórios como IL-1 α e TNF- α (Metzger, 2000; Katchburian e Arana, 2004).

Embora as resinas compostas não sejam colocadas diretamente sobre o tecido pulpar, sabe-se que o monômero residual, particularmente na dependência do período de exposição, pode ser liberado (Schweikl et al., 2006; Brackett et al., 2007; Chang et al., 2010; Schmalz et al., 2011; Pieroni-Grecca, 2013) e atingir o tecido conjuntivo pulpar (Trowbridge, 1984; Katchburian e Arana, 2004). A avaliação da compatibilidade biológica das resinas compostas é de fundamental importância, tendo em vista que a dentina e a polpa são considerados dois tecidos intimamente relacionados, constituindo o complexo dentino-pulpar, que possuem origem embrionária, relação topográfica e função comuns (Mjör, 1983; Katchburian e Arana, 2004; Mjör, 2009, Queiroz, 2011). Todo o complexo dentino-pulpar pode ser atingido quando as resinas compostas são colocadas em cavidades profundas, pois nas proximidades do tecido pulpar de 20 a 39% do volume total da dentina correspondem aos túbulos dentinários

(Trowbridge, 1984; Katchburian e Arana, 2004). Nesta região, além de mais numerosos, o diâmetro dos túbulos é maior, variando entre 2,5 e 3,0 μm , diferentemente dos túbulos dentinários na periferia (Garberoglio e Bastrom, 1976; Mjör, 1983; Katchburian e Arana, 2004).

Dessa maneira, é válido ressaltar que a citotoxicidade de um material é também dependente da espessura e da permeabilidade da dentina residual, já que determinam a quantidade de difusão de uma substância para o interior da polpa (Bouillaguet et al., 2000; Murray et al., 2001; Duque et al., 2006; Queiroz, 2011). Os materiais restauradores usualmente são irritantes ao tecido pulpar, especialmente quando o remanescente dentinário apresenta espessura inferior a 0,5 mm (Stanley, 1992), ao passo, que quando esse remanescente dentinário apresenta espessura igual ou superior a 1,0 mm foi capaz de proteger a polpa dos efeitos citotóxicos desses materiais (Pameijer et al., 2010; Queiroz, 2011).

Em particular, os monômeros não polimerizados das resinas compostas odontológicas podem ser liberados a partir da matriz de resina e, assim, gerar resposta inflamatória no tecido pulpar de intensidade variável (Spahl et al., 1998; Lee et al., 2006). Além disso, o contato das resinas compostas em restaurações extensas de Classe V e Classe II com o tecido gengival tem provocado sido relatado como causa de gengivite localizada (Stanley, 1992; Tadin et al., 2013).

Pelo exposto, o presente estudo avaliou o efeito citotóxico de algumas resinas compostas, com e sem fotopolimerização, no intuito de verificar a capacidade tanto da resina como de monômeros não polimerizados alterarem a viabilidade celular e estimularem a produção de citocinas. Diversos estudos prévios investigaram a toxicidade de monômeros isoladamente em diversos tipos celulares (Geurtsen et al., 1998; Rathbun et al., 1999; Wataha et al., 1999; Bouillaguet et al., 2000; Geurtsen, 2000; Kleinsasser et al., 2004; Schweikl et al., 2005; Becher et al., 2006; Kleinsasser et al., 2006; Goldberg, 2008; Chang et al., 2010; Wisniewska-Jarosinska et al., 2011; Kuan et al., 2012), entretanto, esta avaliação de monômeros isolados não reproduz fidedignamente o modo de utilização desses materiais rotineiramente na clínica, que consiste na sua forma polimerizada, ou seja, na forma de resina composta.

Estudos prévios avaliaram o tempo de fotopolimerização das resinas compostas e a viabilidade celular, e observaram que quanto maior o tempo de fotopolimerização, maior o grau de conversão do monômero e menor a toxicidade do material testado (Caughmann et al., 1991; Stanley, 1992; Aranha et al., 2010). Ainda, foi relatado que a resposta pulpar é mais intensa em cavidades profundas quando a polimerização

incompleta da resina permite maior concentração de monômeros residuais ao redor do tecido pulpar (Rakich et al., 1999).

No presente estudo, os resultados obtidos mostraram que a resina Filtek™ Silorane fotopolimerizada, nas concentrações de 80, 40 e 20 mg/ml não apresentou citotoxicidade por meio do Ensaio de MTT, sendo essas semelhantes estatisticamente ao controle, nos períodos de 6, 12 e 24 horas, após 15 dias de extração dos componentes dessas resinas. Entretanto, a mesma resina, não fotopolimerizada, em todas as concentrações utilizadas, apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, diminuindo a viabilidade celular, em torno de 20% e 40%, nos períodos de 12 e 24 horas respectivamente. Aos 45 dias da extração foi observada redução da viabilidade celular com a resina Filtek™ Silorane na concentração de 20mg/ml, 6 e 24 horas após a incubação com as células. Por outro lado, após 120 dias de extração, as resinas não se apresentaram citotóxicas.

A resina Filtek™ Silorane apresenta um sistema monomérico inovador obtido a partir da reação de moléculas de siloxane e oxirane. Estas resinas à base de silorane têm apresentado propriedades físicas satisfatórias quando comparadas às resinas à base de metacrilato (Ilie e Hickel, 2011b). Em estudo prévio foi verificado que a resina Hermes (3M/ESPE), livre de metacrilato e precursora da resina Filtek™ Silorane, apresentou baixa citotoxicidade para fibroblastos 3T3, quando comparadas às resinas à base de metacrilato (Brackett et al., 2007). *In vivo*, a resina composta Filtek™ Silorane apresentou compatibilidade tecidual, após a implantação no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos (Ruiz-de-Castañeda et al., 2011) e não causou alterações nos tecidos pulpar e periapical após restauração de cavidades profundas em dentes de cães (Ruiz-de-Castañeda et al., 2013).

Entretanto, os nossos achados revelaram que a resina Filtek™ Silorane foi citotóxica, *in vitro*, sobre macrófagos RAW 264.7 de camundongos, principalmente quando a resina não havia sido fotopolimerizada, uma vez que houve redução da viabilidade celular, de 20% a 40%. A possível diferença entre a citotoxicidade observada no presente estudo e a compatibilidade satisfatória obtida em outros estudos do nosso grupo de pesquisa (Ruiz-de-Castañeda et al., 2011, 2013) pode ser devido à fotopolimerização incompleta ou completa da resina composta, respectivamente. É importante ressaltar, também, que a resposta obtida *in vivo* é orquestrada por diversos tipos celulares, diferentemente do que acontece em um experimento *in vitro*.

A resina composta Kalore™, à base de um novo monômero de metacrilato, o DX-511, apresenta resultados clínicos e mecânicos satisfatórios (Kalore™ GC FUJI, 2009; Terry et al., 2009). Entretanto, há somente um estudo publicado na literatura que enfoca os efeitos biológicos dessa resina, que verifica as possíveis alterações no DNA de células epiteliais, após a exposição à resina composta de restaurações Classe V (Tadin et al., 2013). Embora não tenha sido avaliada a genotoxicidade dos materiais no presente estudo, nossos resultados mostraram que a resina Kalore™ apresentou efeitos citotóxicos 24 horas após exposição ao extrato da resina incubada por 15 dias. Por outro lado, a exposição ao extrato da resina incubada por 45 e 120 dias não apresentou efeitos citotóxicos sobre os macrófagos.

Ainda, o efeito citotóxico de dois materiais restauradores fotopolimerizáveis com e sem Bis-GMA (Clearfil Majesty Posterior e Clearfil Majesty Flow, respectivamente) foi observado em fibroblastos NIH-3T3 quando colocados em contato direto com as células (Ausiello et al., 2013). Embora, o presente estudo tenha sido realizado a partir do contato indireto com as células, nossos resultados também evidenciaram morte celular quando da incubação de macrófagos RAW 264.7 com a resina Kalore™ e com a resina à base de Silorane. Embora o mecanismo de morte celular não tenha sido explorado neste estudo, em estudo prévio foi demonstrado que as resinas Filtek™ Silorane e de Filtek™ Supreme XT induziram a apoptose de queratinócitos humanos (Schulz, 2012).

Nossos resultados evidenciaram que embora as resinas convencionais Filtek™ Z250 e Charisma® sejam à base de metacrilato, foi observada diferença na viabilidade celular em contato com compósitos que não pode ser atribuída à composição da matriz orgânica dessas resinas compostas, que é constituída de Bis-GMA/Bis-EMA/UDMA e Bis-GMA/TEGDMA, respectivamente, uma vez que observaram um aumento na citotoxicidade dos monômeros na seguinte ordem: Bis-GMA>UDMA>TEGDMA>HEMA (Urcan et al., 2010).

Estudos em cultura de células têm mostrado que os monômeros dimetacrilatos podem provocar, em concentrações subtóxicas, um aumento da expressão de citocinas (Gregson et al., 2008), ou quando tóxicos, inibirem a secreção de citocinas como TNF- α e IL-1 β , indicando que podem ser prejudiciais à resposta inflamatória ao alterar uma das principais funções dos macrófagos (Rakich et al., 1998, 1999). Nesse sentido, qualquer substância que é capaz de aumentar ou suprimir a capacidade do macrófago para secretar mediadores inflamatórios representa um risco em um ambiente em que a

cura bem sucedida requer a função normal do macrófago (Metzger, 2000; Katchburian e Arana, 2004).

Nossos resultados demonstraram que as resinas Kalore™, fotopolimerizada ou não, no período de 15 dias de extração, apresentaram-se tóxicas à cultura de macrófagos RAW 264.7 e estimularam a produção de TNF- α . Estes resultados divergem de achados prévios que revelaram que os monômeros resinosos, ao reduzir a atividade das mitocôndrias nas células, alteraram a capacidade de resposta inflamatória de macrófagos, suprimindo a secreção de citocinas como TNF- α induzida por LPS (Rakich et al., 1998; Rakich et al., 1999).

Com relação à produção de outras citocinas inflamatórias, a resina Filtek™ Silorane, fotopolimerizada ou não, no período de 45 dias de extração, estimulou a produção de IL-6 em células RAW 264.7 e apresentou-se citotóxica. Entretanto, no período de 15 dias, não houve produção detectável de IL-6 e aos 120 dias os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Ainda, a resina Kalore™, diferentemente da resina Filtek™ Silorane, estimulou a produção de IL-10, aos 15 dias de extração. Entretanto, no período de 45 dias de extração, a resina Kalore™ fotopolimerizada inibiu a produção de IL-10, após 12 horas de incubação e aos 120 dias de extração não houve produção detectável de IL-10 em nenhum dos grupos avaliados.

Os extratos das resinas compostas Charisma® e Filtek™ Z250, obtidos aos 15, 45 e 120 dias de incubação, não foram citotóxicos 24 horas após a estimulação das células, pois a porcentagem de viabilidade celular se manteve similar ao controle.

Contudo, estudos adicionais em outros níveis de investigação e em períodos mais longos de observação, incluindo estudos *in vivo* e estudos clínicos em dentes hígidos e com lesões de cárie, devem ser realizados com a finalidade de fornecer suporte ao uso clínico das resinas compostas à base de metacrilato convencional, modificada ou livre de metacrilato.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Considerando as condições específicas deste trabalho, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ✓ A produção de TNF- α e IL-6 não foi detectada em fibroblastos da linhagem L929, após 6, 12 e 24 horas de contato indireto com as resinas compostas Kalore™ e Filtek™ Silorane. Por outro lado, a produção de TNF- α foi detectada em macrófagos da linhagem RAW 264.7, mas não foi influenciada pelo contato indireto com as resinas compostas, com exceção da resina Filtek™ Silorane que inibiu a produção de TNF- α , após 12 horas de incubação.
- ✓ Em cultura de macrófagos RAW 264.7 de camundongos, os extratos das resinas compostas Kalore™ e Filtek™ Silorane incubadas por 15 dias, foram mais citotóxicos do que os extratos incubados por 45 e 120 dias. A citotoxicidade da resina composta Kalore™ não foi influenciada pela fotopolimerização enquanto a citotoxicidade da resina Filtek™ Silorane foi maior no grupo não fotopolimerizado. Os extratos das resinas compostas Charisma® e Filtek™ Z250, obtidos aos 15, 45 e 120 dias de incubação, não foram citotóxicos 24 horas após a estimulação das células.
- ✓ Em cultura de macrófagos RAW 264.7 de camundongos, a resina Kalore™, fotopolimerizada ou não, além de citotóxica, estimulou a produção de TNF- α , aos 15 dias da extração. No mesmo período, a resina Filtek™ Silorane não fotopolimerizada foi citotóxica, mas não houve alteração significativa na produção de TNF- α . Ainda, a resina Filtek™ Silorane, fotopolimerizada ou não, estimulou a produção de IL-6 no período de 45 dias de extração.
- ✓ A resina Kalore™, diferentemente da resina Filtek™ Silorane, estimulou a produção de IL-10, aos 15 dias de extração. Entretanto, no período de 45 dias de extração, a resina Kalore™ fotopolimerizada inibiu a produção de IL-10, após 12 horas de incubação e aos 120 dias de extração não houve produção detectável de IL-10 em nenhum dos grupos avaliados.

Referências

REFERÊNCIAS

1. 3M ESPE. Technical product profile: The Induction of Gene Mutations and Micronuclei by Oxiranes and Siloranes in Mammalian Cells. Germany (Seefeld): 3M ESPE Dental Products; 2004. 47p.
2. 3M ESPE. Technical product profile: Title: Light-Source, Material and Measuring-Device Effects on Contraction Stress in Composites. Germany (Seefeld): 3M ESPE Dental Products; 2005. 18p.
3. Anusavice, K.J. Phillips materiais dentários. Rio de Janeiro. Elsevier, 2005.
4. Aranha AM, Giro EM, Hebling J, Lessa FC, Costa CA. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative composite resin on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(5):461-6.
5. Ashby, J. Concept Evaluation: An Assay for Receptor-Mediated and Biochemical Antiestrogens Using Puberal Rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2002; 35: 393-397.
6. Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of UEDMA BisGMA and TEGDMA on selected mechanical properties of experimental resin composites. *Dent Mater.* 1998; 14(1):51-6.
7. Assed S. *Odontopediatria: Bases científicas para a prática clínica.* São Paulo: Artes Médicas, 2005.
8. Ausiello P, Cassese A, Miele C, Beguinot F, Garcia-Godoy F, Jeso BD, Ulianich L. Cytotoxicity of dental resin composites: an in vitro evaluation. *J Appl Toxicol.* 2013; 33(6):451-7.
9. Bagis YH, Baltacioglu IH, Kahyaogullari S. Comparing microleakage and the layering methods of silorane-based resin composite in wide Class II MOD cavities. *Oper Dent.* 2009; 34(5):578-85.
10. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater.* 2006; 22(7):630-40.
11. Boaro LC, Gonçalves F, Guimarães TC, Ferracane JL, Versluis A, Braga RR. Polymerization stress, shrinkage and elastic modulus of current low-shrinkage restorative composites. *Dent Mater.* 2010; 26(12):1144-50.
12. Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15:47-60.
13. Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, Gonzalez L, Rakich DR, Meyer JM. Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater* 2000; 16:213-217.

14. Boulden JE, Cramer NB, Schreck KM, Couch CL, Bracho-Troconis C, Stansbury JW, Bowman CN. Thiol-ene-methacrylate composites as dental restorative materials. *Dent Mater*. 2011; 27(3):267-72.
15. Bowen RL e Marjenhoff WA. Dental Composites/Glass Ionomers: The Materials. *Adv Dent Res* 1992; 6:44-49.
16. Brackett MG, Brackett WW, Browning WD, Rueggeberg FA. The effect of light curing source on the residual yellowing of resin composites. *Oper Dent*. 2007; 32(5):443-50.
17. Braga RR e Ferracane JL. Alternatives in polymerization contraction stress management. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2004; 15(3): 176-184.
18. Burke FJ. From extension for prevention to prevention of extension: (minimal intervention dentistry). *Dent Update*. 2003; 30(9):492-8, 500, 502.
19. Burke FJ, Wilson NH, Cheung SW, Mjör IA. Influence of patient factors on age of restorations at failure and reasons for their placement and replacement. *J Dent*. 2001; 29(5):317-24.
20. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials*. 1991; 12(8):737-40.
21. Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KM, Rao VS, Moura DJ, Rosa RM, Henriques JA, Pessoa C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(3):388-92.
22. Chang MC, Chen LI, Chan CP, Lee JJ, Wang TM, Yang TT, Lin PS, Lin HJ, Chang HH, Jeng JH. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials* 2010; 31(32):8164-71.
23. de Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials: an in vitro analysis. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(2):113-8.
24. Dopheide B, Heiss M, Lee R, Reinfields K. Kalore technical manual. GC Co.; 2010.
25. Duque C, Hebling J, Smith AJ, Giro EM, Oliveira MF, de Souza Costa CA. Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in nonhuman primate teeth. *J Oral Rehabil*. 2006; 33(6):452-61.
26. Eick JD, Kotha SP, Chappelow CC, Kilway KV, Giese GJ, Glaros AG. Properties of silorane-based dental resins and composites containing a stress-reducing monomer. *Dent Mater* 2007; 23:1011-7.

27. Eick JD, Smith RE, Pinzino CS, Kotha SP, Kostoryz EL, Chappelow CC. Photopolymerization of developmental monomers for dental cationically initiated matrix resins. *Dent Mater.* 2005; 21(4):384-90.
28. Eliades G., Eliades T., Brantley WA., Watts DC. Dental materials In Vivo: Aging and Related Phenomena. Quintessence, 2003; 79-122.
29. Emmeler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater.* 2008; 24(12):1670-5.
30. Ferracane JL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6(4):302-18.
31. Ferracane JL. Developing a more complete understanding of stresses produced in dental composites during polymerization. *Dent Mater* 2005; 21:36-42.
32. Finer Y., Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 2004; 83(1):22-26.
33. Fung EY, Ewoldsen NO, St Germain HA Jr, Marx DB, Miaw CL, Siew C, Chou HN, Gruninger SE, Meyer DM. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(1):51-8.
34. Gao BT, Lin H, Zheng G, Xu YX, Yang JL. Comparison between a silorane-based composite and methacrylate-based composites: shrinkage characteristics, thermal properties, gel point and vitrification point. *Dent Mater J.* 2012; 3;31(1):76-85.
35. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol.* 1976; 21(6):355-62.
36. GC America Offers Cutting-edge Nanocomposite. Compendium, July/August 2009. Disponível em http://www.gceurope.com/pid/l_bosnia/manual/GC_Kalore.pdf. Acesso em: 02/05/2013.
37. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3):333-55.
38. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 41: 474-480.
39. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig.* 2008; 12(1):1-8.
40. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15:13-27.
41. Gregor L, Bortolotto T, Feilzer AJ, Krejci I. Shrinkage Kinetics of a Methacrylate- and a Silorane-based Resin Composite: Effect on Marginal Integrity. *J Adhes Dent.* 2012 [Epub ahead of print]

42. Gregson KS, Terrence O'Neill J, Platt JA, Jack Windsor L. In vitro induction of hydrolytic activity in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol dimethacrylate and monocyte chemotactic protein-1. *Dent Mater.* 2008; 24(11):1461-7.
43. Hickel R, Manhart J. Longevity of restorations in posterior teeth and reasons for failure. *J Adhes Dent.* 2001; 3(1):45-64.
44. Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7(2):172-9.
45. Ilie N, Hickel R. Investigations on a methacrylate-based flowable composite based on the SDR™ technology. *Dent Mater.* 2011; 27(4):348-55. (b)
46. Ilie N, Hickel R. Resin composite restorative materials. *Aust Dent J.* 2011; 56(1):59-66. (a)
47. International Organization for Standardization (ISO). ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices – Tests for in vitro cytotoxicity. Switzerland; 2009.
48. Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials* 2002; 23(7):1707-19.
49. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9(2):179-200.
50. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral.* Guanarabara Koogan, 2004.
51. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials.* 2006; 27(9):1762-70
52. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent.* 2004; 32(3):229-34.
53. Kopperud HM, Schmidt M, Kleven IS. Elution of substances from a silorane-based dental composite. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118(1):100-2.
54. Kostoryz EL, Eick JD, Rozzi SM, Chappelow CC, Glaros AG, Jacobs DW, Oxman JD, Yourtee DM. Biocompatible oxirane-based dental composites. *J Dent Res* 2001; 80(152):931
55. Kostoryz EL, Tong PY, Strautman AF, Glaros AG, Eick JD, Yourtee DM. Effects of dental resins on TNF-alpha-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *J Dent Res* 2009; 80(9):1789-1792.

56. Krifka S, Seidenader C, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(1):215-24.
57. Kuan YH, Huang FM, Li YC, Chang YC. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF κ B activation via PI3K/Akt pathway. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(11):4003-9.
58. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang H. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater.* 2006; 22(12):1086-92.
59. Lien W, Vanderwalle KS. Physical properties of a new silorane-based restorative system. *Dent Mater.* 2010; 26(4): 337-44.
60. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(1):1-8.
61. Mitchell RJ, Koike M, Okabe T. Posterior amalgam restorations-usage, regulation, and longevity. *Dent Clin North Am.* 2007; 51(3):573-89.
62. Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009; 20(1):3-16.
63. Mjör IA. Interactions between filling materials and the dental pulp. *Inf Dent.* 1983; 65(38):3605-12.
64. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983; 65 (1-2), 55-63.
65. Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, Smith AJ. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. *Biomaterials.* 2000; 21(16):1711-21.
66. Naoum SJ, Ellakwa A, Morgan L, White K, Martin FE, Lee IB. Polymerization profile analysis of resin composite dental restorative materials in real time. *J Dent.* 2012; 40(1):64-70.
67. Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect.* 1996;104(3):298-305.
68. Orimoto A, Suzuki T, Ueno A, Kawai T, Nakamura H, Kanamori T. Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on antioxidant responsive element-mediated transcription: a possible indication of its cytotoxicity. *PLoS One.* 2013; 8(3).
69. Örtengren U. On composite resin materials: degradation, erosion and possible adverse effects in dentists. *Swed Dent J.* 2000; 141:1-61.
70. Palin WM, Fleming GJ, Burke FJ, Marquis PM, Randall RC. Monomer conversion versus flexure strength of a novel dental composite. *J Dent.* 2003; 31(5):341-51.

71. Pameijer CH, Zmener O, Alvarez Serrano S, Garcia-Godoy F. Sealing properties of a calcium aluminate luting agente. *Am J Dent* 2010; 23(2):121-4.
72. Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105(2):97-116.
73. Pfeifer CS, Ferracane JL, Sakaguchi RL, Braga RR. *J Dent Res.* 2008; 87(11):1043-7.
74. Phillips RW. *Skinner: materiais dentários.* 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.276-90.
75. Pieroni-Grecca. Liberação de compostos orgânicos das resinas Kalore™ e Filtek™ Silorane em função da fonte de luz polimerizada, do meio de armazenamento e do pH. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2013.
76. Prachi J, Rujuta C. Silorane Composite System. Review Article. *Scientific Journal.* 2008.
77. Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect.* 2000; 108(1):21-7.
78. Queiroz A. Expressão de Metaloproteinases da Matriz e Resposta Tecidual Frente a Agentes Cimentantes – Estudo no Tecido Conjuntivo Subcutâneo de Camundongos e no Complexo Dentino-Pulpar de Dentes de Cães. 129 f. Tese (Livre-Docência). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2011.
79. Radz GM. Composite resins in 2013: an update on their progress. *Compend Contin Educ Dent.* 2013; 34(1):48-51.
80. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J Endod.* 1998; 24(8):528-33.
81. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod.* 1999; 25(2):114-7.
82. Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE. Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25(4):443-57.
83. Rawls HR, Esquivel-Upshaw J. Resinas restauradoras In: Anusavice KJ. *Phillips - materiais dentarios.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 375-417.
84. Rho YJ, Namgung C, Jin BH, Lim BS, Cho BH. Longevity of Direct Restorations in Stress-Bearing Posterior Cavities: A Retrospective Study. *Oper Dent* 2013.

85. Ricketts DN, Pitts NB. Traditional operative treatment options. *Monogr Oral Sci.* 2009; 21:164-73.
86. Rietschel ET, Cavaillon JM. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. *Microbes Infect.* 2003; 5(15):1407-14.
87. Rodrigues Junior SA, Scherrer SS, Ferracane JL, Bona A'LD. Microstructural characterization and fracture behavior of a microhybrid and a nanofil composite. *Dent Mater J.* 2008; 24:1281-8.
88. Rueggeberg FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent.* 2002; 87(4):364-79.
89. Ruiz-de-Castañeda E, Gatón-Hernández P, Rodriguez EG, Silva RA, Nelson-Filho P, Silva LA. Pulpal and periapical response after restoration of deep cavities in dogs' teeth with Filtek Silorane and Filtek Supreme XT systems. *Oper Dent.* 2013; 38(1):73-81.
90. Ruiz-de-Castañeda E, Silva LA, Gatón-Hernández P, Consolaro A, Rodriguez EG, Silva RA, Queiroz AM, Nelson-Filho P. Filtek™ Silorane and Filtek™ Supreme XT resins: tissue reaction after subcutaneous implantation in isogenic mice. *Braz Dent J.* 2011;22(2):105-10.
91. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12:136-51.
92. Schafer TE, Lappc A, Hanes CM, Lewis JB, Wataha JC, Schuster GS. Estrogenicity of bisfenol A and bisfenol A dimethacrylate in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 45: 192–197.
93. Schmalz G, Krifka S, Schweikl H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers. *Adv Dent Res* 2011; 23(3):302-6.
94. Schmalz G. Material science: biological aspects. *J. Dent. Res.* 2002; 81(10):660-663.
95. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent* 1994; 22(2):6-11.
96. Schulz SD, König A, Steinberg T, Tomakidi P, Hellwig E, Polydorou O. Human gingival keratinocyte response to substances eluted from silorane composite material reveal impact on cell behavior reflected by RNA levels and induction of apoptosis. *Dent Mater.* 2012; 28(8):135-42.
97. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wieczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials* 2005; 26: 1713–1719.

98. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001; 80:1615–1620.
99. Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W. The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells in vitro. *J Dent Res*. 2004; 83(1):17-21.
100. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006; 85(10):870-7.
101. Shajii L, Santerre JP. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. *Biomaterials* 1999; 20(20):1897-908.
102. Söderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in Dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc*. 1999; 130(2): 201-9.
103. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent*. 1998; 26(2):137-45.
104. Stanley HR. Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. *Adv Dent Res* 1992; 6:55-64.
105. Tadin A, Galic N, Mladinic M, Marovic D, Kovacic I, Zeljezic D. Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials. *Clin Oral Investig* 2013. [Epub ahead of print]
106. Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Matsuo M, Ebisu S. Estrogenicity of fissure sealants and adhesive re-sins determined by reporter gene assay. *J. Dent. Res*. 2000; 79: 1838–1843.
107. Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJ. The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *J mater sci mater med* 1998; 9(1):17-22.
108. Terry DA, Leinfelder KF, Blatz MB. A comparison of advanced resin monomer technologies. *Dent Today*. 2009; 28(7):122-3.
109. Trowbridge HO. Pulp histology and physiology. In: Cohen S, Burns RC. *Pathways of the pulp*. St. Louis: Mosby; 1984.
110. Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials* 2010; 31(8):2010-4.
111. Vasington PJ; Piersma HD; Corbett JJ; Bittle JL. Cytotoxicity of rubber closures in tissue culture systems. *J. Pharm. Sci*. 1967; 56:1276-9.
112. Völkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1281-7.

113. Wada H, Turami H, Imazato S, Narimatsu M, Ebisu S. In vitro estrogenicity of resin composites. *J. Dent. Res.* 2004; 83: 222–226.
114. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater.* 2012; 28(1):23-40.
115. Wataha JC, Rueggeberg FA, Lapp CA, Lewis JB, Lockwood PE, Ergle JW, Mettenburg DJ. In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clin Oral Investig.* 1999; 3(3):144-9.
116. Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dent Mater* 2005; 21:68–74.
117. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29:2941–53.
118. Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, Blasiak J. Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(7):4603-11.
119. Yaman BC, Efes BG, Dörter C, Gömeç Y, Erdilek D, Yazıcıoğlu O. Microleakage of repaired class V silorane and nano-hybrid composite restorations after preparation with erbium:yttrium-aluminum-garnet laser and diamond bur. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(2):163-70.
120. Yang ML. The effects of cytotoxicity and genotoxicity induced by 2,2-bis[4-(acryloxypropoxy)phenyl]propane via caspases in human gingival fibroblasts. *Toxicol Ind Health* 2012. [Epub ahead of print]
121. Zimmerli B, Strub M, Jeger F, Stadler O, Lussi A. Composite materials: composition, properties and clinical applications. A literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2010; 120(11):972-86.