

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Guilherme Senna Figueiredo Azevedo

**INTERFERÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE CERÂMICA NA POLIMERIZAÇÃO
DE CIMENTOS RESINOSOS E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS
BIOLÓGICAS DE CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES**

Belo Horizonte
2018

Guilherme Senna Figueiredo Azevedo

**INTERFERÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE CERÂMICA NA POLIMERIZAÇÃO
DE CIMENTOS RESINOSOS E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS
BIOLÓGICAS DE CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de Concentração: Clínicas Odontológicas.

Linha de Pesquisa: Propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Coorientador: Prof. Alberto Nogueira da Gama Antunes

Belo Horizonte

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

A994i Azevedo, Guilherme Senna Figueiredo
Interferência de diferentes tipos de cerâmica na polimerização de cimentos resinosos e seus efeitos nas características biológicas de células imunocompetentes / Guilherme Senna Figueiredo Azevedo. Belo Horizonte, 2018.
148 f. : il.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
Coorientador: Alberto Nogueira da Gama Antunes
Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Cimentos dentários. 2. Citocinas. 3. Leucócitos. 4. Polpa dentária. 5. Restauração (Odontologia) – Pesquisa. 6. Polimerização. I. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. II. Antunes, Alberto Nogueira da Gama. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314:615.46

Ficha catalográfica elaborada por Fernanda Paim Brito - CRB 6/2999

Guilherme Senna Figueiredo Azevedo

**INTERFERÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE CERÂMICA NA POLIMERIZAÇÃO
DE CIMENTOS RESINOSOS E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS
BIOLÓGICAS DE CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração: Clínicas Odontológicas.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Rodrigo Richard da Silveira – UFMG
- 2- Profa. Dra. Mônica Yamauti – UFMG
- 3- Profa. Dra. Márcia Almeida Lana – PUC Minas
- 4- Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto – PUC Minas
- 5- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 23 de março de 2018

A tese, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me dar saúde necessária para alcançar meus objetivos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza por toda sua orientação e ajuda nesta longa caminhada. Ajuda esta muito além da tarefa de um mentor, mas sim de um exemplo de dedicação, paciência e profissionalismo, um exemplo de MESTRE.

Agradeço também ao Prof. Dr. Alberto Nogueira da Gama Antunes por sua colaboração imprescindível e determinante para a elaboração deste projeto. Muito obrigado!

Agradeço também a Prof. Dra. Walderez Ornelas Dutra pelo apoio e suporte na execução da parte experimental realizada no Laboratório de Biologia de Interações Celulares-ICB/UFMG e a aluna de doutorado Luiza Mourão Magalhães por sua importante colaboração nas etapas laboratoriais deste estudo.

Gostaria também de agradecer a FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto.

Agradeço também ao Prof. Marcus Vinicius Tolentino do Departamento de Química da PUC Minas pelas incontáveis e indispensáveis horas dedicadas a realização da parte experimental no laboratório de análises químicas da PUC Minas.

Gostaria também de fazer um agradecimento especial ao Prof. Wellington Corrêa Jansen, grande incentivador e mentor deste projeto na fase embrionária. Você nos faz muita falta. Saudades.

Não poderia também de deixar agradecer a Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais por permitir que mais etapa da minha vida profissional fosse concluída. Universidade esta na qual me formei na graduação e tenho muito orgulho de lecionar há 17 anos.

Devemos sempre na vida ter exemplos a serem observados. O que seria de nós se não tivéssemos um dos maiores presentes de Deus: FAMÍLIA. Portanto gostaria de dedicar mais esta etapa da minha vida às pessoas mais do que especiais que me mostraram sempre o valor de honestidade, caráter, garra, carinho e dedicação: ao meu saudoso pai Mauri Alves de Azevedo e avô Hélio Senna Figueiredo e a quem Deus ainda me permite desfrutar de todo o carinho maior que um ser humano pode me dar: minha mãe, Sônia, amiga, guerreira e ao mesmo tempo dócil e a minha avó Cléia um ser humano invejado que em 97 anos de vida

nos ensina o valor de educação, carinho e respeito ao próximo. E a minha irmã Renata por todo seu apoio, carinho, amor, compreensão e ajuda ao longo desses anos. Amo vocês!

Gostaria também de agradecer a minhas tias Maria Eugênia e Regina por sempre estarem presente em todas as etapas da minha vida com carinho e dedicação. Muito obrigado!

Finalmente gostaria de agradecer o maior presente que a vida me deu: minha esposa Tininha e meus amores Bernardo e Beatriz.

Tininha, muito obrigado por ser essa esposa companheira, amorosa, dedicada e guerreira. Não seria tão feliz como sou hoje sem você na minha vida. Te amo!

Bernardo e Beatriz: o que eu poderia dizer sobre vocês? Nada, pois é impossível dizer em palavras o que vocês representam para mim. Amo vocês! Minha alegria de viver. Bê obrigado por cada olhar, cada gesto de ternura e cada beijo na madrugada. Bia, obrigado por toda paixão, carinho, por cada sorriso gostoso e por me fazer rir todos os dias. Por mim, por vocês e pela sua mãe tento ser uma pessoa melhor a cada dia. Caminho eterno!!!

RESUMO

Cimentos resinosos, polimerizados por meio de ativação química e pela luz, são amplamente utilizados em restaurações dentárias cerâmicas. Entretanto, a transmissão de luz é atenuada pela cerâmica, podendo interferir na polimerização do cimento e comprometer a longevidade do conjunto restauração/cimento resinoso. Monômeros e outras substâncias liberadas podem alcançar a polpa dentária por meio dos túbulos dentinários e afetar células imunocompetentes presentes em resposta às bactérias cariogênicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência de cerâmicas na transmissão de luz para polimerização de cimentos resinosos e os efeitos de substâncias liberadas destes cimentos na atividade de células imunocompetentes estimuladas com bactérias cariogênicas. Para isso, cimentos MultLink Speed, seT, RelyX U200 e RelyX Ultimate foram polimerizados com luz de LED através de discos das cerâmicas Design, Emax, Emax CAD e Lava Ultimate. A transmitância da luz foi determinada, bem como o grau de conversão de monômeros dos cimentos em diferentes tempos, pelo método FTIR. Os discos de cimentos polimerizados foram mergulhados em meio de cultura por 24 horas e este adicionado a células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de 10 indivíduos. Parte das CMSP foi previamente estimulada com *Streptococcus mutans*. Em seguida foram realizadas avaliação da viabilidade celular e quantificação de células apoptóticas e de monócitos produtores de citocinas, por meio de citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a transmitância direta de luz para todas as cerâmicas testadas foi menor que 20%, com menor valor para Design. Análise pelo FTIR mostrou que a fotopolimerização através da cerâmica Design reduziu significativamente o grau de conversão dos cimentos MultLink Speed, seT, U200 e Ultimate quando comparado a fotopolimerização através da cerâmica e.max®, em diferentes tempos. Em concentrações maiores de sobrenadante, U200 reduziu a viabilidade de CMSP. Mesmo em concentrações menores, U200 aumentou a percentagem de CMSP necróticas ou em apoptose tardia, quando estas foram previamente estimuladas com *S. mutans*. Embora nenhum dos cimentos testados tenha afetado significativamente a apoptose ou a necrose de monócitos, nos grupos estimulados com *S. mutans* os cimentos reduziram as frequências de monócitos produtores de citocinas. Ainda sob estimulação com *S. mutans*, U200 apresentou menores frequências de monócitos produtores de IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α .

quando comparado ao MultLink Speed e seT apresentou menores frequências de monócitos produtores de IL-6, IL-8 e TNF- α quando comparado ao MultiLink Speed. Nossos dados mostram que diferentes cerâmicas apresentam diferentes transmitâncias de luz e que isto afeta o grau de conversão de monômeros dos cimentos resinosos em diferentes tempos. U200 apresenta maior citotoxicidade para CMSP em relação aos demais cimentos testados e substâncias liberadas dos cimentos seT e U200 nas primeiras 24 horas são capazes de reduzir significativamente as frequências de monócitos produtores de citocinas quando estimulados com bactéria cariogênica. Como o grau de conversão de monômeros é sensível ao tipo de cerâmica e está relacionada com a liberação de substâncias dos cimentos, a utilização clínica desses materiais pode afetar diferentemente a resposta celular na polpa inflamada por produtos bacterianos, influenciando os processos de combate aos microrganismos e proteção do tecido pulpar.

Palavras-chave: Cimento resinoso. Monômeros resinosos. Citocinas. *Streptococcus mutans*. Leucócitos.

ABSTRACT

Resin cements are widely used to cement ceramic restorations, and some of these cements are polymerized by chemical or light activation or both methods. However, light transmission can be attenuated through the ceramic, interfering in the polymerization of the underlying resin cement, which could compromise the longevity of the restoration / resin cement. In addition, monomers and other released substances can reach the dental pulp through the dentinal tubules and affect pulp cells, such as cells of the inflammatory infiltrate present in response to cariogenic bacteria. The objective of this study is to evaluate the effect of different ceramic materials on the light transmission for polymerization of resin cements at the degree of monomer conversion and biocompatibility of immunocompetent cells stimulated with cariogenic bacteria. Different resin cements were polymerized with LED light through different ceramic discs and the degree of conversion of resin cement monomers was determined in different times by the FTIR method, as well as the transmittance of the light by the ceramics. To evaluate the biocompatibility, disks of polymerized resin cements were immersed in culture medium and added to peripheral blood mononuclear cells of 10 individuals to determine cell viability by the MTT method. Besides PBMC incubated with media obtained from the cement disks will be stimulated or not with *S. mutans* to evaluate the production of pro and anti-inflammatory cytokines by means of immunofluorescence reactions and flow cytometry. The results showed that the direct light transmittance for all the ceramics tested was less than 20%, with a lower value for d.SIGN. Analysis by FTIR showed that photopolymerization through d.SIGN significantly reduced the degree of conversion of MultLink Speed, seT PP, U200 and Ultimate cements when compared to photopolymerization through e.max ceramics, at different times. At higher supernatant concentrations, U200 reduced the viability of PBMC. Even at lower concentrations, U200 increased the percentage of necrotic PBMC or late apoptosis when these were previously stimulated with *S. mutans*. Although none of the cements tested significantly affected apoptosis or monocyte necrosis, in the *S. mutans* stimulated groups the cements reduced the frequencies of cytokine-producing monocytes. In addition to the stimulation with *S. mutans*, U200 presented lower frequencies of IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α positive monocytes when compared to MultLink Speed and seT PP showed lower frequencies of monocytes

producing IL-6, IL-8 and TNF- α when compared to MultiLink Speed. Our data show that different ceramics have different light transmittances and that this affects the degree of conversion of monomers of the resin cements at different times. U200 exhibited higher cytotoxicity to PBMC compared to the other cements tested. Substances released from the seT PP and U200 cements in the first 24 hours were able to significantly reduce the frequencies of cytokine-producing monocytes when stimulated with cariogenic bacteria. As the degree of conversion of monomers is sensitive to the type of ceramic and related to the release of substances from the cements, the clinical use of these materials may affect the cellular response in the pulp inflamed by bacterial products, influencing the processes to combat microorganisms and protection of pulp tissue.

Keywords: Resins cement. Resins monomers. Cytokines. *Streptococcus mutans*. Leucocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BisGMA	Bis-fenol glicidil dimetacrilato
CAD/CAM	(<i>computer-aided design/computer-aided manufacturing</i>) desenho assistido por computador/manufatura assistida por computador
CMSP	células mononucleares de sangue periférico
CQ	canforoquinona
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDMA	Etileno glicol dimetacrilato
FTIR	<i>Fourrier Transformed Infrared Spectroscopy</i> (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
IgA	imunoglobulina A
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LPS	lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
ROS	<i>reactive oxigen species</i>
TEGDMA	Trietilen glicol dimetacrilato
TGF- β	fator de crescimento transformante-beta
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
UDMA	Uretano dimetacrilato

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema de preparação dos discos de cimentos resinosos em matriz de silicone contendo dois compartimentos. A ponta do aparelho de fotopolimerização foi acoplada à matriz de silicone com auxílio de um dispositivo cilíndrico para uniformizar a incidência da luz e evitar dispersão da mesma.57

FIGURA 2: Gráfico Dotplot granulose versus CD14, mostrando a população de monócitos CD14⁺ selecionada nos grupos Controle e *S. mutans* (Sm).62

FIGURA 3: Gráfico Dotplot mostrando a percentagem de células produtoras de TNF- α dentro da população de monócitos CD14⁺ nos grupos Controle e *S. mutans* (Sm).62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	25
2.1 Cimentos resinosos	25
2.2 Polimerização dos cimentos resinosos	27
2.3 Cerâmicas odontológicas.....	30
2.4 Propriedades ópticas das cerâmicas odontológicas.....	33
2.5 Biocompatibilidade dos materiais resinosos	36
2.6 Resposta imunoinflamatória da polpa dental	41
3 HIPÓTESES.....	51
4 OBJETIVOS.....	53
4.1 Objetivo geral	53
4.2 Objetivos específicos.....	53
5 MATERIAL E MÉTODOS	55
5.1 Obtenção dos corpos de prova de cerâmica	55
5.2 Análise de transmitância de luz através de cerâmicas	55
5.3 Preparo dos discos de cimento resinoso	55
5.4 Avaliação do grau de conversão de monômeros por espectroscopia infravermelho de Fourier (FTIR).....	57
5.5 Preparo dos sobrenadantes de cimentos resinosos	58
5.6 Preparo das bactérias	58
5.7 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico	59
5.8 Ensaio de MTT	59
5.9 Estimulação das CMSP para avaliação da morte celular e das citocinas	60
5.10 Quantificação de células apoptóticas e necróticas	60
5.11 Reações de imunofluorescência para detecção de citocinas	61
5.12 Citometria de fluxo	61
5.13 Análises estatísticas	63
6 ARTIGO CIENTÍFICO 1	65
7 ARTIGO CIENTÍFICO 2	95
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
REFERENCIAS.....	131
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas.....	147

1 INTRODUÇÃO

Com a evolução dos sistemas adesivos e cimentos resinosos as restaurações cerâmicas sem metal têm sido muito utilizadas na odontologia devido às excelentes propriedades estéticas, biocompatibilidade e durabilidade (DELLA BONA; NOGUEIRA; PECHO, 2014; VICHI et al., 2011).

Apesar da alta resistência à compressão, as cerâmicas não apresentam deformação plástica, ou seja, fraturam quando são submetidas a forças extremas. Desta forma, as restaurações cerâmicas devem ser cimentadas de forma adesiva, garantindo que o estresse da mastigação seja distribuído através da estrutura dentária (DELLA BONA; KELLY, 2008). Os cimentos resinosos apresentam polimerização química (mistura base/ativadora), física (dependente da luz) ou dupla (química e física, também chamada de dual). Para os cimentos físicos ou duais, que dependem da fotoativação, a excitação somente ocorrerá na presença de luz em adequado comprimento de onda e irradiância suficiente (DIAS et al., 2008; FLURY; LUSSI; HICHEL, 2013). Desta forma, a translucidez e espessura das cerâmicas deve ser considerada como fator relevante tanto do ponto de vista estético, mas também como fator determinante para adequada polimerização do cimento resinoso subjacente (ILIE; HICKEL, 2008; WATTS; CASH, 1994).

Os fenômenos de reflexão e absorção da luz podem atenuar sua incidência através da cerâmica, interferindo na polimerização do cimento resinoso subjacente, o que poderia comprometer a longevidade do conjunto restauração/cimento resinoso (ARHEGAS et al., 2012; DIAS et al., 2008).

Cimentos duais foram desenvolvidos para aliar as vantagens dos cimentos fotoativados com as vantagens dos cimentos quimicamente ativados, ou seja, para conseguir alcançar um adequado grau de conversão (GC) permitindo otimizar propriedades físicas e mecânicas, possibilitando entre outros fatores o acabamento imediato das restaurações após a cimentação (CAUGHMAN; CHAN, RUEGGEBERG, 2001). Polimerização de materiais resinosos envolve a geração de radical livre onde o material passa do estágio viscoso para rígido. Durante este processo a cadeia alifática de ligações de carbono $C=C$ são quebrados em ligações covalentes de carbono $C-C$ entre os grupos metacrilatos dos monômeros, gerando uma reação em cadeia pela propagação de radicais livres. A medida que a reação se desenvolve, a difusão destes radicais livre sofre uma redução acentuada e

consequentemente a conversão de monômeros não é finalizada. Assim, ao final da reação parte dos monômeros permanece com ligações duplas, ou seja, monômeros não reagidos. Estes monômeros não reagidos irão diminuir as propriedades físicas e mecânicas (KUMBULOGLU et al., 2004), aumentando a degradação do material (GONÇALVES et al., 2008) e podendo causar danos à polpa dentária (ELIADES et al., 2013; FERRACANE, 1994; GERZINA; HUME, 1996; LEUNG, 2001; SANTERRE; SHAJII; THONEMANN et al., 2002).

A liberação destes monômeros e demais componentes do sistema de polimerização das resinas compostas tem sido relacionada a várias reações biológicas desfavoráveis, incluindo toxicidade sistêmica e local, alterações pulpare e alérgicas (BOUILLAGUET, 2004; GEURTSSEN, 2000; SCHWEIKL et al., 2006). Além disso, efeitos genotóxicos e citotóxicos também têm sido relatados (BAKOPOULOU et al., 2009).

Alguns dentes com necessidade de restaurações indiretas exibem lesões cariosas e, deste modo, o tecido pulpar pode se encontrar inflamado em resposta a bactérias cariogênicas e seus produtos (GERZINA; HUME, 1996). A intensidade da resposta do tecido pulpar diante dos agentes agressores depende do tipo, duração e intensidade do estímulo, além das condições do próprio tecido, podendo resultar em formação de dentina reacional e até necrose pulpar (GERZINA; HUME, 1996). Esta resposta envolve o recrutamento e ativação de leucócitos do sangue e produção de diversos mediadores inflamatórios, dentre eles as citocinas, as quais regulam os processos de combate aos agentes agressores e de destruição tecidual (BAILEY; WEIR; WASHBUM, 2006).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito de diversos materiais cerâmicos na transmissão de luz para polimerização de diferentes cimentos resinosos, quanto ao grau de conversão de monômeros, e verificar o efeito de substâncias liberadas desses cimentos na produção de citocinas por leucócitos humanos expostos a bactérias cariogênicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cimentos resinosos

O sucesso clínico de restaurações de cerâmica pura depende, em grande parte, de uma adesão confiável entre a cerâmica e substratos dentários através de um agente cimentante. Com o desenvolvimento da odontologia adesiva, cimentos resinosos tem sido a escolha para união entre as restaurações cerâmicas e estrutura dentária (FABIANELLI et al., 2006; PISANI-PROENÇA et al., 2006). Entretanto, a longevidade destas restaurações requer adesão à estrutura dental com alta resistência, baixa solubilidade e união ao esmalte e dentina por uma fina camada de cimento adesivo. Nesse sentido, o ideal é que o agente cimentante resinoso esteja completamente polimerizado para se obter adequadas propriedades físicas e mecânicas (PISANI-PROENÇA et al., 2006).

Os cimentos resinosos são compostos híbridos que possuem uma fase orgânica a base de monômeros resinosos como Bis-GMA, UDMA e TEGMA, e uma fase inorgânica composta por partículas de carga unidas a matriz resinosa por meio de grupos silanos e iniciadores de polimerização, como a canforoquinona (RUEGGEBERG; CAUGHMAN; CURTIS Jr., 1994). Podem ser classificados de acordo com sua forma de ativação: quimicamente ativado, fotoativado e dual (ativação química e física).

Os cimentos quimicamente ativados são indicados em restaurações espessas, na cimentação de pinos intraradiculares, coroas confeccionadas com materiais que bloqueiam a passagem da luz, para otimizar as propriedades mecânicas destes materiais em situações clínicas onde a luz não consegue alcançar (FERRACANE et al., 1981). Entretanto, estes cimentos apresentam algumas desvantagens, como tempo de trabalho reduzido e instabilidade de cor devido a altas concentrações de aminas terciárias como ativadores (FERRACANE; MOSER; GREENER, 1981).

Os cimentos fotoativados apresentam limitações em relação à espessura e cor das restaurações que impedem a transmissão da luz para ativar os fotoiniciadores adequadamente (BRAGA; FERRACANE, 2004; CAUGHMAN; CHAN; RUEGGEBERG, 2001). Por outro lado, estes cimentos permitem remoção de excessos mais facilmente, são mais homogêneos por não necessitarem de mistura e apresentam menor porosidade (TASKONAK; MECHOLSKY Jr.; ANUSAVICE, 2005).

Cimentos resinosos duais foram desenvolvidos para combinarem as vantagens das propriedades químicas e foto ativadas, podendo ser usados em áreas profundas onde há uma redução da penetração de luz (van MEERBEEK et al., 1994). Nos cimentos duais a cinética de polimerização envolve dois mecanismos distintos: uma polimerização induzida pela presença de luz e polimerização química efetiva para os locais onde a luz não consegue alcançar. Nestas situações, a intensidade de luz que atinge o cimento é suficiente para iniciar o processo de polimerização física e a polimerização química, através de um catalisador, é necessária para conseguir um grau máximo de conversão dos monômeros. Estes cimentos apresentam-se normalmente em duas pastas, uma contendo a amina e o fotoiniciador e outra contendo o peróxido de benzoila. Entretanto, muitos estudos têm relatado que a maioria destes cimentos de dupla polimerização é extremamente dependente da luz e a polimerização química sozinha não é capaz de promover uma adequada polimerização desses materiais (ARRAIS et al., 2008; MENG; YOSHIDA; ATSUTA, 2008; PAPAZPGLOU; RAHIOTIS; KAKABOURA, 2006).

Além da classificação dos cimentos resinosos quanto à forma de ativação, os cimentos também podem ser classificados como convencionais e autoadesivos. Os cimentos convencionais são aqueles que utilizam um sistema adesivo prévio (ácido, primer e adesivo) à inserção dos cimentos, devendo a dentina ser deixada levemente umedecida após a remoção do ácido fosfórico (LOGUERCIO et al., 2007). Estes materiais são muito sensíveis à técnica, sendo dependentes de alguns fatores, como quantidade de água remanescente na dentina, evaporação do solvente, infiltração completa dos monômeros resinosos na dentina desmineralizada, podendo ocasionar deficiente grau de polimerização, redução das propriedades mecânicas do adesivo e sensibilidade pós-operatória (LOGUERCIO et al., 2007; REIS et al., 2008).

Os cimentos autoadesivos foram introduzidos no mercado em 2002. Diferentemente dos cimentos adesivos convencionais, os agentes cimentantes autoadesivos não utilizam sistema adesivo prévio, simplificando assim a técnica de utilização. Estes cimentos apresentam uma boa retenção, baixa solubilidade na cavidade oral, diminuição da sensibilidade pós-operatória, menor susceptibilidade a umidade e biocompatibilidade aceitável, além de promover retenção micromecânica à dentina de modo semelhante aos cimentos adesivos convencionais (RADOVIC et al., 2008). Por não utilizarem ácido fosfórico, estes materiais dependem da interação química e mecânica entre o cimento e substrato dental (PAVAN; BERGER;

BEDRAN-RUSSO, 2010). Esta micro-retenção ao substrato dental é possível devido a monômeros ácidos que simultaneamente desmineralizam e infiltram o substrato dentário, promovendo uma retenção micromecânica. Reações secundárias têm sido demonstradas para promover união química adicional dos grupamentos funcionais com a hidroxiapatita, uma característica somente comprovada no cimento de ionômero de vidro (BEHR et al., 2004; DE MUNCK et al., 2004; GUARDA et al., 2010). Na literatura, esta interação com o substrato é considerada superficial sem a formação de uma camada híbrida distinta ou *tags* de resina (CANTORO et al., 2011; DE MUNCK et al., 2004). A reação dominante ocorre via polimerização livre de radical, iniciada tanto por luz quanto por um sistema redox que permite a polimerização em um ambiente ácido (GUARDA et al., 2010). A neutralização desta acidez do cimento é promovida pela adição de ionômero de vidro o que resulta em aumento de pH de um para seis (RADOVIC et al., 2008). Nestes cimentos autoadesivos a água tem um papel fundamental na eficácia da reação, pois é gerada durante a neutralização dos grupos funcionais, contribuindo para a hidrofilicidade inicial do cimento, aumentando a adaptação ao substrato dental e a tolerância à umidade (GUARDA et al., 2010).

2.2 Polimerização dos cimentos resinosos

O processo de polimerização dos cimentos resinosos ocorre através da abertura das duplas ligações de carbono e subsequente ligação das moléculas dos monômeros para formar uma rede polimérica tridimensional com ligações cruzadas intermoleculares. A quebra das ligações duplas ocorre via radicais livres, gerando novos radicais reativos que são responsáveis pela continuação, propagação e terminação (ANUSAVICE, 2003).

O início da reação (fase de iniciação) ocorre através da ativação de um agente que se quebra e forma um radical livre. Este radical é uma molécula com um nível de energia elevado, com um elétron não pareado na sua camada de valência, que pode levar este estado a outra molécula através de colisão (FONSECA et al., 2001). Ao reagirem com o radical livre, os monômeros têm um elétron extraído, tornando-se instáveis. Assim, eles procuram se unir a outros monômeros a fim de se estabilizarem, sendo essa fase chamada de propagação da reação (ANUSAVICE, 2003). A propagação pode seguir através de adição de novos monômeros, por

ligação intramolecular (ciclização) ou por ligação intermolecular, também denominada de ligação cruzada (ANDRZEJEWSKA, 2004). À medida que a reação se processa, há formação da rede polimérica e consequente diminuição da mobilidade do meio reacional, o que leva a uma redução na velocidade da reação (SIDERIDOU; TSERKI; PAPANASTASIOU, 2002). A etapa de terminação da reação pode ocorrer através de duas formas: terminação bi-molecular ou transferência de cadeia. A terminação bi-molecular ocorre quando dois macrorradicais (cadeias com vários monômeros ligados e ativos) se encontram, podendo ocorrer uma combinação, na qual se forma uma cadeia longa, ou desproporcionamento, o que gera dois polímeros mortos, um com ligação insaturada e outro com ligação saturada. A transferência de cadeia ocorre quando um radical encontra um monômero e transfere o seu elétron para o mesmo, passando esse monômero então a ser o radical que irá continuar a reação de polimerização (ANDRZEJEWSKA, 2001). A diferença nos tipos de polimerização em relação a ativação (quimicamente ativada, fotoativada ou dual) está na maneira pela qual o radical livre será formado.

Os cimentos quimicamente ativados se apresentam na forma pasta/pasta. Em uma das pastas está contido o peróxido de benzoila, que é o iniciador, e na outra pasta está a amina terciária aromática. O peróxido de benzoila quebra a amina terciária, gerando dois radicais livres que iniciam o processo de polimerização (ANUSAVICE, 2003).

Os cimentos fotoativados apresentam-se em pasta única. Esta pasta contém o ativador, amina terciária, e o fotoiniciador, sendo o mais comum a canforoquinona. Quando esta pasta é exposta a luz com um comprimento de onda apropriado (468 nm aproximadamente), ocorre excitação do fotoiniciador e este reage com a amina terciária formando os radicais livres que iniciam a reação de polimerização em cadeia (ANUSAVICE, 2003).

O número de radicais livres e a proporção em que são formados constituem os fatores mais importantes na reação de polimerização (RUEGGEEBERG; CAUGHMAN; CHAN, 1999), pois o grau de conversão de polímeros de um compósito depende da formação destas moléculas. O grau de conversão representa em percentual a quantidade de ligações insaturadas (covalentes duplas) de carbono convertidas em ligação saturadas (covalentes simples) (ANUSAVICE, 2003; PARK, 1996). Por exemplo: um grau de conversão de 70% não significa que há 30% de monômeros residuais (monômeros não convertidos), mas que 30% das ligações

insaturadas não foram convertidas em ligações simples (ANUSAVICE, 2003; PARK, 1996). O grau de conversão máximo obtido pelos cimentos resinosos é de aproximadamente 60% (KUMBULOGLU et al., 2004).

Uma polimerização incompleta (baixo grau de conversão) gera um aumento de absorção de água, diminuição da dureza de superfície, diminuição da resistência à compressão e diminuição da força de adesão entre o cimento e o substrato, causando um aumento da velocidade de degradação na linha de cimentação devido à acidez presente no biofilme da cavidade oral (MORAES et al., 2009; SILVA et al., 2013). Esta degradação da linha de cimento nas margens das restaurações pode comprometer a integridade da restauração, seja por perda de selamento marginal, fratura ou cárie secundária (D'ARCANGELO et al., 2014).

Na literatura existe um consenso de que um alto grau de conversão é essencial para otimizar as propriedades mecânicas (FERRACANE, 1985; RUEGGEBERG; CAUGHMAN; CURTIS Jr., 1994; RUEGGEBERG; CRAIG, 1988), biocompatibilidade (BAGIS; RUEGGEBERG, 2000; CAUGHMAN et al., 1991) e estabilidade de cor (MORAES et al., 2009; RUYTER; NILNER; MOLLER, 1987).

Estudos têm mostrado que a utilização da luz para polimerização influencia as propriedades físico-químicas dos cimentos duais, pois a fotopolimerização melhora as propriedades mecânicas, como dureza superficial, módulo de elasticidade e também aumenta o grau de conversão (FLURY et al., 2014; ILIE; HICKEL, 2008) e a biocompatibilidade (FLURY; LUSSI; HICHEL, 2013). O grau de conversão no processo de polimerização dos materiais resinosos duais depende da energia recebida por estes materiais, sendo diretamente proporcional à intensidade da luz emitida pelo fotopolimerizador e o tempo de exposição (HEFFERNAN et al., 2002; OLSSON et al., 2003).

Os cimentos fotoativados e os cimentos duais quando ativados por luz na presença de restaurações com espessura menor que 2 mm apresentam um grau de conversão maior que os cimentos quimicamente ativados (ILIE; HICKEL, 2008; UCTASLI; HASANREISOGLU; WILSON, 1994). Quando um cimento dual é utilizado sem a presença de luz, as propriedades mecânicas, como resistência flexural e dureza superficial, são reduzidas para 68,9% e 91,1%, respectivamente, em comparação com valores originais de cimentos duais quando a luz é utilizada (CANTORO et al., 2011).

De maneira geral a ativação química dos cimentos duais não parece compensar a ausência de luz em restaurações espessas ou opacas mesmo após 24 horas após o início da reação de polimerização (ACQUAVIVA et al., 2009; HASEGAWA; BOYER; CHAN, 1991; RUEGGERBERG; CAUGHMAN; CURTIS Jr., 1994; UCTASLI; HASANREISOGLU; WILSON, 1994). O grau de conversão dos cimentos duais autocondicionantes pode variar de 37% quando fotoativados por 20 segundos a 58% quando fotoativados por 40 segundos, evidenciando uma direta correlação entre a intensidade de luz recebida por materiais que são fotoativados e o grau de conversão (MORAES et al., 2009).

O grau de conversão é maximizado durante os primeiros 30 minutos (AGUIAR et al., 2010; YAN et al., 2010) com aumento gradual no grau de conversão até às 24 horas após o início da reação de polimerização, especialmente quando utilizados no modo dual (FRASSETTO et al., 2012; SANTOS JÚNIOR et al., 2004; YAN et al., 2010). Em testes de microdureza, valores baixos são associados com uma incompleta polimerização do cimento resinoso (FERRACANE; CONDON, 1999; RASSETTO et al., 2000). Consequentemente, poderá ocorrer uma diminuição das propriedades mecânicas, aumento da absorção de água e micro infiltração. Adicionalmente, moléculas de monômeros não polimerizados podem se destacar do material, causando inflamação nos tecidos adjacentes. Por estas razões, é importante otimizar o processo de polimerização para um melhor desempenho clínico dos materiais resinosos e obtenção de melhores propriedades mecânicas (DeWALD; FERRACANE, 1987).

2.3 Cerâmicas odontológicas

As cerâmicas odontológicas são compostas por duas fases: uma fase cristalina circundada por uma fase vítrea. A matriz vítrea é composta por uma cadeia básica de óxido de silício (SiO_4), que está relacionada com a viscosidade e expansão térmica da porcelana, óxido de potássio feldspato ($\text{K}_2\text{O}.\text{Al}_2\text{O}_3.\text{Si}_6\text{O}_2$) ou soda-feldspato ($\text{Na}_2\text{O}.\text{Al}_2\text{O}_3.\text{Si}_6\text{O}_2$), ou ambos. Esta fase é formada durante o processo de cocção e possui propriedades típicas de um vidro, como: friabilidade, padrão de fratura não direcional e alta tensão superficial no estado fluido (CHAN; BOYER, 1989). A fase cristalina inclui sílica ou quartzo e alguns óxidos metálicos (pigmentos) e é responsável pelas propriedades mecânicas e óticas. Pigmentos,

opacificadores e vidros são adicionados para controlar a temperatura de fusão, temperatura de sinterização, coeficiente de contração térmica e solubilidade (CHAN; BOYER, 1989).

Cerâmicas feldspáticas foram as primeiras a serem utilizadas tanto como cobertura de infraestruturas metálicas, quanto como coroas de porcelana pura. Entretanto, apesar de ótimas propriedades estéticas, sua baixa resistência limitou sua indicação para restaurações anteriores em regiões de baixo estresse oclusal (KRAMER et al., 2009; STEVENSON; LBBETSON, 2010).

Na tentativa de melhorar as propriedades destes materiais, metais foram utilizados como infraestrutura para as porcelanas, pois a união conseguida entre estes dois materiais impede uma flexão e deformação da cerâmica reduzindo a propagação de trincas (KELLY, 2004). Entretanto, a presença do colar metálico nas margens das restaurações e a opacidade do metal nas restaurações metalo-cerâmicas, impedindo uma maior transmissão de luz similar ao dente natural, constituíram um importante fator limitante estético (BRECKER, 1967). Assim, para minimizar as desvantagens do metal, foi desenvolvida uma cerâmica com núcleo de alumina em substituição ao metal nas restaurações metalo-cerâmicas, como um exemplo típico de aumento da resistência pela dispersão da fase cristalina. A alumina possui alto módulo de elasticidade (350 GPa) e alta resistência a fratura (3,5 - 4 MPa) (SEGHI; SORENSEN, 1995). Sua composição é semelhante à porcelana feldspática, porém a diferença marcante é a incorporação, em peso, de 40 a 50% de cristais de alumina à fase vítrea. Isto resultou no aumento da resistência do material de 120 a 180 Mpa, aproximadamente o dobro da resistência da porcelana feldspática. A melhora nas propriedades físicas deste material se deve não somente às propriedades mecânicas da alumina, mas também à sua compatibilidade com a massa de porcelana. Inicialmente, a porcelana aluminizada era utilizada como base, por ser mais resistente e apresentar natureza opaca, o que poderia interferir negativamente na estética (SEGHI; SORENSEN, 1995).

No início dos anos 90, a técnica de cera perdida foi introduzida como um método de processamento inovador para restaurações sem metal. Nesta técnica, a moldagem pela injeção a quente sob pressão (*“heat pressing”*), utiliza um padrão em cera de infraestrutura a ser produzida, a qual é incluída em um molde refratário. Este refratário é colocado no interior de um forno convencional para eliminar a cera, pré-aquecido a 700°C, durante 30 minutos. Dessa forma, cria-se um espaço para o seu

preenchimento subsequente com a vitrocerâmica. Ainda neste forno, a pastilha de cerâmica, que pode ser reforçada tanto pela leucita quanto pelo dissilicato de lítio, é posicionada na abertura do refratário, juntamente com o cursor de alumina. Este conjunto, (refratário, cerâmica, cursor de alumina) é inserido no interior do forno desenvolvido para a técnica, o qual introduz a cerâmica por meio de fluxo viscoso. A temperatura inicial é de 700°C, com taxa de aquecimento de 60°C/min, com temperatura final de 920°C e 1180°C (dissilicato de lítio e leucita respectivamente) para a injeção da cerâmica, mantendo tempo de injeção por 20 min à pressão de 5 bar (IVOCLAR VIVADENT).

Com este novo método de processamento, em 1998 surgiu um novo sistema cerâmico denominado IPS Empress II (Ivoclar/Vivadent) onde cristais de dissilicato de lítio foram acrescentados de forma dispersa à matriz vítrea das cerâmicas feldspáticas, melhorando as propriedades mecânicas sem prejudicar as propriedades óticas das cerâmicas vítreas. Este tipo de cerâmica apresenta resistência flexural de 400 Mpa, podendo ser indicada também para próteses parciais fixas de três elementos anteriores até segundo pré-molar (DELLA BONA; KELLY, 2008). Este sistema é constituído por 70% de cristais de dissilicato de lítio dispersos densamente e unidos a matriz (MARTINS et al., 2010). Embora estes materiais de vidro permitam a fabricação de restaurações relativamente translúcidas, recomenda-se que estas sejam condicionadas e cimentadas adesivamente para aumentar sua resistência e longevidade (BINDL; LUTHY; MORMANN, 2006; ISGRÓ; ADDISON; FLEMING, 2011).

Recentemente foi desenvolvido um sistema de dissilicato de lítio prensado (e.max® Press, Ivoclar Vivadent) com melhores propriedades físicas e translucidez, que passa por um processo de queima diferente (KOKUBO, 2008). A produção desse material passa por duas fases cristalinas: o dissilicato de lítio e o metassilicato de lítio. Esse processo de dupla nucleação ocorre simultaneamente. A microestrutura do dissilicato de lítio prensado consiste em aproximadamente 70% de cristais de dissilicato de lítio em uma matriz vítrea. Estes cristais medem aproximadamente 3-6 µm em comprimento (IVOCLAR VIVADENT).

2.4 Propriedades ópticas das cerâmicas odontológicas

As propriedades biomecânicas das cerâmicas odontológicas têm sido extensivamente estudadas (BALADHANDAYUTHAM; LAWSON; BURGESS, 2015; GONZAGA et al., 2011; LIN et al., 2012; MAGNE; PARANHOS; SCHLICHTING, 2011). A interação da luz com a cerâmica é determinante para o resultado estético final. Entretanto, poucos dados sobre suas propriedades óticas têm sido relatados. Esta interação é importante para a obtenção de resultados estéticos que considerem as diferentes espessuras de preparo, a cor do substrato dentário e o padrão de cor e opacidade dos dentes naturais dos pacientes e a transmissão de luz através da cerâmica (DELLA BONA; ANUSAVICE, 2002).

Na dentição natural, a luz incidente pode ser refletida, dispersada ou absorvida. Os prismas do esmalte são responsáveis pelo espalhamento da luz, enquanto a dentina absorve parte da luz incidente (ZIJP; BOSCH; GROENHUIS, 1996). As propriedades óticas do dente também são afetadas pela transmissão da luz difusa (BRODBELT et al., 1981). A escolha das cerâmicas nos casos de grande exigência estética é devida, além de suas propriedades físicas, à capacidade de mimetizar a cor e a vitalidade dos dentes, reproduzindo com equilíbrio o padrão de absorção e espalhamento da luz (CORCIOLANI et al., 2011; ILIE; HICKEL, 2008).

A translucidez ou opacidade de um material depende da capacidade de transmissão e propagação de luz no seu interior (HEFFERNAN et al., 2002). Assim se a maior quantidade de luz que passa através da cerâmica é espalhada ou dispersada, o material irá parecer opaco. Entretanto quando somente uma pequena parte de luz é espalhada ou refletida e a maior parte é transmitida, o material terá a aparência translúcida. A quantidade de luz transmitida, refletida ou espalhada é determinada pelo comportamento óptico do material e depende das suas características microestruturais e morfológicas, espessura e da luz incidente (HEFFERNAN et al., 2002). Quanto maior a quantidade de conteúdo vítreo no interior da cerâmica, melhor estética, maior transmissão de luz, porém, menor resistência mecânica. Por outro lado, o aumento no conteúdo cristalino permite aos materiais cerâmicos melhores propriedades mecânicas (HEFFERNAN et al., 2002).

Pelo fato das cerâmicas possuírem duas ou mais fases, quando um feixe de luz incide, numerosas reflexões e refrações de luz ocorrem nos limites destas fases, desencadeando um espalhamento de luz (BRODBELT; O'BRIEN; FAN, 1980;

HEFFERNAN et al., 2002). O grau de espalhamento de cada material depende do comprimento de onda da luz incidente, do tamanho das partículas, da composição de cada fase e, conseqüentemente, dos seus índices de refração, além da porosidade presente no material (BRODBELT; O'BRIEN; FAN, 1980; HEFFERNAN et al., 2002). Quanto maior o espalhamento da luz, menor a transmissão dela no interior do material (HEFFERNAN et al., 2002). Com isso, cada tipo de cerâmica utilizada para confecção de uma restauração indireta apresentará um comportamento distinto frente à luz incidente (GIANINI et al., 2014). A quantidade de transmissão de luz através da restauração cerâmica está diretamente relacionada com o potencial de polimerização dos cimentos resinosos e sua diminuição pode reduzir as propriedades físicas dos cimentos, bem como a durabilidade das restaurações e da interface adesiva (BRAGA; CESAR; GONZAGA, 2002; GIANINI et al., 2014; PISANI-PROENCA et al., 2006; WATTS; CASH, 1994).

Watts e Cash (1994) avaliaram a transmissão de luz através de diferentes materiais restauradores e verificaram que grande parte da luz visível emitida durante a polimerização é perdida ao atravessar o material cerâmico ou resinoso. Peixoto et al. (2007) mostraram que o coeficiente de transmissão de luz por diferentes cores de cerâmicas varia de forma significativa e que essa variação foi mais intensa nos discos de porcelana de menor espessura. Gianini et al. (2014) demonstraram atenuação da luz de aproximadamente 90 a 98% em relação à luz incidente na superfície por discos de cerâmicas de 2 mm de espessura. Os autores também demonstraram que a cor A2 da cerâmica de cobertura, bastante utilizada clinicamente nas peças protéticas, também contribui parcialmente para o bloqueio da luz.

Estudos têm mostrado que o grau de conversão dos cimentos resinosos também depende do tipo e espessura do material restaurador indireto (BRODBELT; O'BRIEN; FAN, 1980; FABIANELLI et al., 2006; PISANI-PROENCA et al., 2006). Geralmente quanto mais espessa ou mais escura for a cor da restauração mais crítica será a intensidade de luz para conseguir uma polimerização adequada.

Myers, Caughman e Rueggeberg (1994) avaliaram o efeito da composição, cor e espessura das restaurações em cerâmica para facetas, inlays e coroas, na transmissão de luz e a relação entre luz transmitida e extensão de polimerização de um cimento resinoso fotoativado. Luz halógena convencional foi incidida sobre discos de cerâmica Dicor nas cores A1 e A4, com espessuras de 0,5 a 3 mm, por 20,

40 e 60 segundos para polimerização do cimento Porcelite Kerr. A transmissão foi medida por radiômetro e o grau de polimerização do cimento por espectroscopia infravermelho de Fourier (FTIR). O resultado deste estudo mostrou que numa espessura de 1 mm a intensidade de luz transmitida variou de 100 a 200 mW/cm², enquanto nas espessuras de 3 mm o valor variou entre 0 e 90 mW/cm². A conclusão do trabalho foi que a espessura do material e sua cor tiveram maior influência do que o material utilizado em relação à transmissão de luz. Os autores sugeriram que para restaurações com espessura maior que 1 mm seja utilizado um cimento resinoso dual ou de polimerização química para obtenção de adequada propriedade do cimento.

Dias et al. (2008) investigaram a irradiação (quantidade de energia) e a transmitância de luz através de diferentes cerâmicas vítreas de subestrutura e cobertura em diferentes espessuras. O tipo de cerâmica influenciou significativamente a irradiância e a transmitância, as quais diminuíram com aumento da espessura. Entretanto, a percentagem de transmitância foi maior com aumento do comprimento de onda da luz irradiada, independente do material ou da espessura, corroborando com resultados de estudos prévios (BRODBELT; O'BRIEN; FAN, 1980). Della Bona, Nogueira e Pecho (2014) também mostraram por meio de espectrofotometria que a microestrutura das cerâmicas CAD-CAM influencia a transmitância de luz e que, à medida que se aumenta o comprimento de onda da luz irradiada de 400 para 780 nm, a transmitância da luz aumenta.

Awad et al. (2015) avaliaram a translucência de diferentes materiais cerâmicos CAD/CAM e resinas compostas diretas em relação à espessura e rugosidade, esta última determinada por diferentes tratamentos de superfície. Seus resultados mostraram que a translucência dos materiais foi influenciada primeiramente pela espessura do material, seguido pelo tipo do material testado e tratamento de superfície.

Um estudo mostrou que as propriedades mecânicas, como resistência flexural, módulo de elasticidade e dureza KNOOP dos cimentos duais após a polimerização diminuíram com aumento da espessura dos discos cerâmicos. Segundo os autores, os componentes químicos destes cimentos duais não são capazes de compensar a diminuição da capacidade de transmissão de luz para polimerização à medida que a espessura da cerâmica aumenta. Resultados de Papazoglou, Rahiotis e Kakaboura (2006) corroboraram esses achados, ao demonstrarem que a profundidade de

polimerização e dureza Vickers de um cimento resinoso dual diminuiu com o aumento da espessura dos discos cerâmicos, independentemente da fonte fotopolimerizadora utilizada. Segundo esses autores, o uso de catalisador químico de polimerização seria importante para produzir uma profundidade de polimerização semelhante ou maior que os cimentos fotopolimerizáveis.

Flury, Lussi e Hickel (2013) avaliaram o grau de conversão por espectroscopia FTIR de cinco cimentos resinosos duais (Panavia F2, RelyX Unicem 2, SpeedCem, BisCem e BeautiCem) sob diferentes modos de ativação: LED segunda geração (Elipar, 1.545 mW/cm^2 , 40s) e LED terceira geração (VALO, 2.179 mW/cm^2 , 32s e 4.156 mW/cm^2 , 18s). A luz irradiada emitida pelas fontes de luz foi medida através das cerâmicas vítreas IPS Empress CAD (LT A3) e Emax CAD (LT A3) com espessuras de 1,5 e 3 mm. A irradiância diminuiu 80% através dos discos de 1,5 mm e 95% através dos de 3 mm. Houve ligeira redução do grau de conversão para o cimento fotoativado sob as cerâmicas de 1,5 mm (48%) e de 3 mm (45%), sem diferença significativa entre as cerâmicas.

Noronha Filho et al. (2010) avaliaram o grau de conversão dos cimentos resinosos Enforce (Dentsply), RelyX ARC (3M ESPE), Variolink II (Ivoclar Vivadent) e All Cem (FGM) sob ativação química (mistura pasta base e catalisadora sem presença de luz), dual e sob discos cerâmicos de 2 mm de espessura (IPS Empress 2). Para todos os cimentos, o grau de conversão foi maior para o grupo dual, seguido do grupo dual com cerâmica e finalmente os quimicamente ativados. Concluiu-se que os cimentos resinosos podem apresentar baixo grau de conversão quando submetidos à ativação através de cerâmicas com translucência igual ou menor que do IPS Empress 2 em espessuras de 2 mm.

2.5 Biocompatibilidade dos materiais resinosos

Materiais resinosos para uso odontológico como resinas compostas e cimentos resinosos possuem uma cadeia de polímeros que são susceptíveis a efeitos hidrolíticos e higroscópicos em níveis variados, dependendo da sua composição e estrutura. Além disto, estes materiais resinosos podem liberar componentes que não reagiram no processo da polimerização, sendo responsáveis também pela degradação do material na cavidade oral, o que diminui sua vida útil (FERRACANE, 2006; GERZINA; HUME, 1996; GEURTSSEN, 2000). A

compatibilidade biológica dos materiais resinosos é predominantemente determinada pela quantidade e pela natureza dos componentes orgânicos e seus efeitos decorrem da ação de substâncias liberadas na cavidade bucal ou polpa dental (BOUILLAGUET, 2004; EMMLER, 2008; URCAN et al., 2010).

Os componentes liberados a partir das resinas compostas à base de metacrilato (convencionais) são monômeros residuais, ou seja, monômeros que não polimerizaram completamente (SCHMALZ; KRIFKA; SCHWEIKL, 2011). A liberação desses compostos tem sido relacionada com toxicidade sobre DNA (SCHWEIKL; SCHMALZ; SPRUSS, 2001; SCHWEIKL et al., 2005; URCAN et al., 2010), liberação de estrógeno (OLEA et al., 1996; SCHAFER et al., 1999; SCHWEIKL et al., 2006), alterações do sistema imune, hipersensibilidade e citotoxicidade (CHANG et al., 2010; KUAN et al., 2012).

A liberação de monômeros residuais das resinas compostas é influenciada por vários fatores entre eles a química do material (especialmente a solubilidade e peso molecular dos monômeros usados), o grau de conversão, o grau de *crosslinking* da cadeia de polímeros, o tratamento da superfície das partículas de carga e a natureza do solvente (FERRACANE, 2006; SANTERRE; SHAJII; LEUNG, 2001; SIDERIDOU; ACHILIAS, 2005). O processo de polimerização dos monômeros de metacrilato por radicais livres produz extensas cadeias de polímeros entrelaçadas (*crosslinking*), mas também deixam monômeros e oligômeros que não reagiram. Na maioria das resinas compostas o grau de conversão varia entre 55 a 75% quando são polimerizados por fontes de luz halógena ou LED (PIANELLI et al., 1999; SAKAGUCHI; BERGE, 1998; TARLE et al., 2002) e pode alcançar até 80% quando são polimerizadas em diferentes condições laboratoriais, como alta intensidade de luz, calor, pressão ou combinação de um ou mais fatores (PEUTZFELDT; ASMUSSEN, 1999). Por outro lado, o grau de conversão pode ser entre 25-35% se o oxigênio estiver em contato com a superfície da resina durante a reação de polimerização (camada inibida por oxigênio), fazendo com que mais monômeros não reativos sejam liberados da cadeia de polímeros, podendo contribuir para um risco biológico significativo (YAP et al., 2004).

A quantificação de monômeros residuais é realizada por meio da detecção de duplas ligações de carbono não quebradas (grau de conversão). Entretanto, nem todos os monômeros de grupos metacrilatos que não reagiram são capazes de se desprender da cadeia de polímeros em meio aquoso, pois são parte de moléculas

dimetacrilato unidas por ligações covalentes a uma extremidade da cadeia de polímeros (RUEGGERBERG; CAUGHMAN; CHAN, 1999). Estudos têm mostrado que aproximadamente 10% ou menos dos grupos de monômeros de metacrilato que não reagiram estão como monômeros residuais e estão disponíveis para se desprender em vários meios solúveis (FERRACANE, 1994). Ensaio de eluição mostraram que 0,05% a 2% do peso das resinas é reduzido em meio aquoso e 2 a 6% em álcool ou outros solventes orgânicos (FERRACANE, 1994; GERZINA; HUME, 1996; MUNKSGAARD; PEUTZFELDT; ASMUSSEN, 2000). Na maioria dos casos o processo de eluição é completado nos primeiros dias ou semanas após o início do processo de polimerização dependendo do solvente (ROSENSTIEL; LAND; CRISPIN, 1998).

A quantidade de componentes que se desprendem da cadeia de monômeros resinosos pode ser afetada pelo protocolo de polimerização e densidade de crosslink da cadeia de polímero. Normalmente, polímeros com um alto grau de crosslink são mais resistentes ao processo de degradação devido aos espaços da estrutura da cadeia ser mais limitados para que as moléculas de solvente possam se difundir dentro desta estrutura (ARIMA; MURATA; HAMADA, 1996; FERRACANE, 1994). Esta é a teoria mais aceita na literatura. Por outro lado, outros estudos têm mostrado que quanto maior a densidade de crosslink da resina, maior a heterogeneidade e o volume dos microporos da cadeia do polímero. Este aumento da heterogeneidade da cadeia poderia aumentar o processo de eluição dos monômeros resinosos (SIDERIDOU; ACHILIAS, 2005).

Especificamente quanto à citotoxicidade, 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 (glutathione) via estresse oxidativo (SCHWEIKL et al., 2005). Monômeros resinosos, ao suprimirem a atividade das mitocôndrias nas células, alteram 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) (RAKICH et al., 1998; RAKICH et al., 1999). Estes resultados indicam que os monômeros podem ser prejudiciais à resposta inflamatória ao alterarem uma importante função dos macrófagos que é a secreção de citocinas (RAKICH et al., 1998; RAKICH et al., 1999).

Interessantemente, embora o monômero Bis-GMA se apresente citotóxico para macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, ele estimula a secreção da citocina pró-inflamatória TNF- α de forma dose-dependente nessas células (KUANG et al., 2012). Neste estudo foi demonstrado que após 2 horas, BIS-GMA, apresentou citotoxicidade e capacidade de estimular a produção de TNF- α , IL-1 α , IL-6, óxido nítrico e derivado do oxigênio. Os resultados deste estudo sugerem que os macrófagos podem induzir resposta inflamatória potencializada quando expostos a determinadas doses do BIS-GMA.

Entre os monômeros resinosos liberados, os monômeros hidrofílicos, como TEGDMA, são encontrados em grandes quantidades no meio de extração aquoso (0.04-2.3% - peso/volume) se comparado ao Bis-GMA (0.03-0.07%) (YAP et al., 2004). Além disto, os monômeros hidrofílicos HEMA e TEGDMA são capazes de se difundir através da dentina em direção a polpa. Esta difusão aumenta à medida que a espessura de dentina diminui, principalmente quando esta for menor do que 1 mm ou após o tratamento ácido da dentina (GERZINA; HUME, 1996). A quantidade de HEMA liberada dos materiais resinosos pode alcançar concentrações entre 1.5-8 mmol/L na polpa (NODA et al., 2002), enquanto concentrações de TEGDMA podem chegar a 4 mmol/L (BOUILLAGUET et al., 1996, SCHWEIKL et al., 2006). Estas concentrações podem ser altas o suficiente para causar efeitos na hemostasia e reparo da polpa dental (BOUILLAGUET, 2004; GERZINA; HUME, 1996; SCHWEIKL et al., 2006).

TEGDMA tem sido o mais estudado em relação à biocompatibilidade, pois é facilmente liberado de resinas compostas polimerizadas em meio aquoso e possui um número alto de duplas ligações de carbono não reagidas (FERRACANE, 2006). Além disto, TEGDMA é um diluente comumente utilizado em muitos materiais resinosos em concentrações que variam de 35 a 50% (FERRACANE, 1994; RUEGGEBERG, 2002).

Clinicamente, os efeitos do TEGDMA em longo prazo e em concentrações sub tóxicas são muito relevantes. Tem sido relatado que TEGDMA suprime a secreção de TNF- α por monócitos THP-1 estimulados ou não por LPS de *E. coli* após 24 horas de exposição, sugerindo potencial de modificação no processo inflamatório dos tecidos pulpaes (NODA et al., 2003).

Exposição a TEGDMA por longos períodos afeta as respostas imunológicas e outros processos fisiológicos, como cicatrização de lesões, diferenciação celular e

metabolismo celular (SPAGNUOLO et al., 2006). Além disso, foi observado que TEGDMA é capaz de afetar o processo de diferenciação de fibroblastos da polpa dental em odontoblastos e, assim, afetar o processo normal de mineralização, mesmo em baixas concentrações (SPAGNUOLO et al., 2006).

HEMA também tem sido extensivamente estudado em relação à biocompatibilidade. É um dos componentes mais comuns dos adesivos dentinários e também dos cimentos resinosos autoadesivos. Possui uma alta afinidade por água que permite uma penetração na malha de colágeno da matriz de dentina, prevenindo o colapso do colágeno (De MUNCK et al., 2005). Devido ao seu baixo peso molecular e alta capacidade hidrofílica, HEMA pode se difundir através da dentina remanescente e afetar a vitalidade dos odontoblastos subjacentes, interferindo na divisão celular (GERZINA; HUME, 1996).

Vários estudos avaliaram a citotoxicidade do HEMA em concentrações muito baixas e em períodos longos, os quais são mais relevantes em condições clínicas. De acordo com estes estudos, HEMA altera a resposta inflamatória normal dos tecidos pulpaes através da diminuição significativa da secreção de TNF- α induzida por LPS de *E. coli*. Outros efeitos a longo prazo de HEMA incluem a interrupção da síntese de colágeno tipo I e significativa alteração no processo de diferenciação de fibroblastos e de odontoblastos, que por sua vez têm importante função na homeostase e reparo pulpar (FALCONI et al., 2007).

Dentre os mecanismos genotóxicos exercidos pelos monômeros resinosos, deve-se ainda considerar a sua ação como indutores de estresse oxidativo intracelular. Como consequência do mecanismo aeróbico das células, pequenas quantidades de espécies reativas do oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) são constantemente geradas nas células e nos tecidos (KRIFKA et al., 2010). Antioxidantes celulares, como a glutathiona, agem para equilibrar e desintoxicar as células contendo estas moléculas reativas. Quando o balanço entre oxidante e anti-oxidante é quebrado, inicia-se o estresse oxidativo e, com a continuidade deste processo, ocorrem danos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, o que eventualmente resulta em efeitos biológicos que levam a alterações nas vias de transdução de sinal e transformação na expressão genética celular, com mutações e morte da célula (DEMIRCI et al., 2008; SCHWEIKL et al., 2006). Além disso, a presença de monômeros resinosos no citosol consome aparentemente grandes

quantidades de antioxidantes impedindo que a oxirredução ocorra normalmente (AROSSI, 2013; LEE et al., 2006).

Monômeros resinosos também induzem estresse oxidativo por meio da formação de ROS em células oriundas de tecidos orais em cultivo (KRIFKA et al., 2010). Este desequilíbrio na homeostase redox causada por monômeros como TEGDMA e HEMA, é uma consequência da redução do sistema anti-oxidante intracelular, no qual há a diminuição da quantidade de glutathione. Na presença de monômeros como TEGDMA ou HEMA, mesmo em baixas concentrações, o aumento dos níveis intracelulares de ROS está relacionado à modificação dos mecanismos reguladores da sobrevivência, proliferação ou apoptose celular (KRIFKA et al., 2010).

Bailey, Weir e Washburn (2006) avaliaram os efeitos de produtos residuais e monômeros resinosos não polimerizados na resposta inflamatória e na viabilidade de macrófagos. Substâncias liberadas de diferentes resinas por meio de lavagens com etanol e meio de cultura RPMI foram quantificadas e incubadas com macrófagos. Grande quantidade de monômeros que não reagiram na polimerização foi liberada das resinas. A resina que continha o sistema Bis-GMA e HEMA apresentou a maior liberação de monômeros e a maior estimulação da expressão de citocinas pelos macrófagos. A alteração na morfologia dos macrófagos foi significativa se comparada ao grupo controle. As citocinas predominantemente liberadas em todos os grupos experimentais foram IL-1 β e TNF- α .

Foi demonstrado também que Bis-GMA diminui significativamente a expressão da molécula de adesão intercelular ICAM-1 em células estimuladas por TNF- α , sugerindo que metacrilatos podem diminuir o recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação (AROSSI, 2013; LEE et al., 2006).

Esses resultados mostram que produtos liberados dos materiais odontológicos resinosos tem potencial de afetar respostas imunoinflamatórias, podendo alterar mecanismos importantes de combate aos microrganismos e de manutenção da integridade de tecidos bucais (AROSSI, 2013; LEE et al., 2006).

2.6 Resposta imunoinflamatória da polpa dental

O conjunto de alterações morfológicas e bioquímicas que ocorre nos tecidos após uma injúria ou infecção é conhecido pelo nome de resposta imunoinflamatória

(CALICH; VAZ, 2009). Durante o processo inflamatório, leucócitos e proteínas plasmáticas migram da microcirculação para o interstício com objetivo de neutralizar o agente agressor. Em resposta a agressão, células teciduais locais produzem mediadores químicos vasoativos como histamina e serotonina, que modificam o diâmetro vascular, além de citocinas e quimiocinas, que estimulam o extravasamento leucocitário (CALICH; VAZ, 2009). No tecido extra vascular, os monócitos se diferenciam em macrófagos e, juntamente com outras células imunocompetentes, iniciam o processo de fagocitose do agente agressor. Esses eventos são mediados pelas citocinas e quimiocinas (CALICH; VAZ, 2009).

As citocinas são produzidas por células residentes (como células epiteliais e fibroblastos), fagócitos (neutrófilos e macrófagos), linfócitos, entre outras, sendo responsáveis pela mediação da intensidade das repostas imune e inflamatória (CEKICI et al., 2014; PETKOVIC' et al., 2010). Sua secreção é uma das primeiras respostas do sistema imune inato às infecções e danos celulares. As citocinas dependem da ligação com receptores específicos de membrana celular da célula alvo para desempenhar a sua atividade. Normalmente as citocinas agem em conjunto, pois são necessárias mais de uma citocina para que uma determinada resposta celular seja ativada (ECKHARDT et al., 2009). A secreção de uma citocina influenciará a produção ou a resposta de outras. Essas moléculas têm uma vida média curta, ações potentes em determinados tipos celulares e atuam regulando a duração e a intensidade da resposta inflamatória (CALICH; VAZ, 2009). Elas podem atuar de forma autócrina, ou seja, quando são capazes de agir sobre as próprias células que a produzem; de forma parácrina, quando agem em células vizinhas sem que para isso tenham que atingir a corrente sanguínea; e endócrina quando agem em células distantes ao seu local de produção. As citocinas atuam de formas distintas, podendo ser classificadas em pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (WELLNER et al., 2012).

Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α ativam o endotélio microvascular, aumentando a expressão de moléculas de adesão, e induzem também a produção de quimiocinas, essenciais para o recrutamento leucocitário seletivo (ECKHARDT et al., 2009). TNF- α é produzido principalmente por monócitos e induz a produção de outras citocinas. Atua principalmente nos macrófagos, estimulando a fagocitose e o choque endotóxico (ECKHARDT et al., 2009). É o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e

outros microrganismos infecciosos, sendo responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves (ECKHARDT et al., 2009). IL-1 é produzida por fagócitos mononucleares ativados por produtos bacterianos, como LPS, e por outras citocinas, como TNF- α , embora também seja produzida por muitos outros tipos celulares, como neutrófilos, queratinócitos e células endoteliais (ECKHARDT et al., 2009).

A IL-6 é secretada principalmente por LT auxiliares, macrófagos e fibroblastos. Sua secreção é estimulada pelas citocinas IL-1 e TNF- α (ECKHARDT et al., 2009). Apresenta papel importante na ativação da resposta imune adaptativa e é descrita como uma citocina pró-inflamatória. Essa molécula é capaz de estimular a diferenciação dos LB, a produção de anticorpos, induzir a proliferação dos linfócitos T e regular positivamente a síntese de proteínas relacionadas à fase aguda da inflamação. Foi demonstrado que IL-6 estimula a reabsorção óssea *in vitro* (ECKHARDT et al., 2009).

A IL-8 é produzida por fagócitos mononucleares ativados por microrganismos e apresenta função quimiotática principalmente para neutrófilos, constituindo mediador importante nas fases iniciais de combate à infecção (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune inata inicial a microrganismos e é um indutor essencial da resposta imune adaptativa. Essa interleucina é um ativador de células NK e potente indutor da secreção de interferon-gama (IFN- γ) por linfócitos T e células NK. As principais fontes de IL-12 são os fagócitos mononucleares ativados e células dendríticas. A IL-12 é uma citocina crítica para a iniciação da ativação da resposta imune celular do tipo Th1, que envolve macrófagos, células NK e linfócitos T. Além disso, é responsável por potencializar a atividade citolítica de células NK e linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

Dentre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 é um inibidor de macrófagos e células dendríticas ativados e está, portanto, envolvida no controle das reações da imunidade natural e da imunidade mediada por células (ECKHARDT et al., 2009; SCHMALZ; SCHWEIKL; HILLER, 2000). A principal função da IL-10 é inibir a síntese de TNF- α , regulando assim a expressão de citocinas pró-inflamatórias e limitando, portanto, a magnitude da resposta imune (ECKHARDT et al., 2009). IL-10 é produzida principalmente por macrófagos ativados e células T reguladoras, como

feedback negativo (ECKHARDT et al., 2009; SCHMALZ; SCHWEIKL; HILLER, 2000). Os macrófagos respondem a microrganismos secretando citocinas e expressando coestimuladores que acentuam a ativação das células T e a imunidade mediada por células. A IL-10 age nos macrófagos ativados para terminar essas respostas e retornar o sistema ao seu estado de repouso à medida que a infecção microbiana é erradicada (ECKHARDT et al., 2009; SCHMALZ; SCHWEIKL; HILLER, 2000).

Outra citocina anti-inflamatória é o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), uma citocina secretada por células T estimuladas por antígenos, fagócitos mononucleares ativados por LPS e muitos outros tipos celulares (ECKHARDT et al., 2009; SCHMALZ; SCHWEIKL; HILLER, 2000). A principal ação do TGF- β no sistema imune é inibir a proliferação e a ativação de linfócitos e outras células, como macrófagos e neutrófilos (ECKHARDT et al., 2009; SCHMALZ; SCHWEIKL; HILLER, 2000).

A polpa dental é constituída por tecido conjuntivo fibroso contendo células imunocompetentes, como linfócitos T, macrófagos e células dendríticas (HAHN; FALKLER Jr.; SIEGEL, 1989; JONTELL; GUNRAJ; BERGENHOLTZ, 1987). Estas células respondem aos estímulos agressores microbianos e químicos, gerando alterações teciduais que caracterizam as lesões pulpares (JONTELL et al., 1998). As células próprias da polpa dental incluem: odontoblastos, que são células responsáveis pela formação e manutenção da dentina; e fibroblastos, que produzem os componentes da matriz extracelular (PASHLEY, 1996; SASAKI; GARANT, 1996). Além de fazerem parte da constituição do complexo dentino-pulpar, essas células parecem desempenhar um papel fundamental na reação da polpa contra agentes microbiológicos infectantes (NANCI, 2003; PASHLEY, 1996). Imediatamente abaixo dos odontoblastos, encontra-se uma área livre de células, denominada zona de Weil, constituída por fibras neurais não mielinizadas, capilares e processos de fibroblastos. Mais centralmente à polpa situa-se a zona rica em células, constituída de fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos, linfócitos, capilares sanguíneos e nervos (HARGREAVES; GOODIS, 2009).

Devido a fatores anatômicos e fisiológicos, o tecido pulpar apresenta limitada capacidade de resposta a invasão bacteriana ou outros estímulos nocivos (JONTELL et al., 1998). Estímulos químicos microbianos vindos pelos túbulos dentinários são capazes de induzir aumento da expressão de moléculas de MHC de classe II, e acúmulo de células dendríticas próximo aos locais onde a dentina reparadora é

invadida por bactérias (OHSHIMA et al., 1995). Além da permeabilidade primária da dentina, a quantidade e a qualidade da dentina reparadora parecem ser um ponto crucial na determinação da quantidade de antígenos vindos pelos túbulos capazes de alcançar a polpa (JONTELL et al., 1998).

As reações teciduais pulpares estão associadas à progressão da doença cárie. Quando o processo carioso é lento, o tecido dentinário irá se alterar reduzindo a permeabilidade e, com isso, menores serão as alterações pulpares. Mas quando o processo carioso é rápido, ocorrem alterações pulpares intensas e baixa capacidade de defesa do tecido dentinário (BJORNDALE; MJOR, 2001), estimulando diferentes tipos de células imunes durante a invasão cariosa (HAHN; FALKLER Jr., MINAH, 1991).

Muitos estudos afirmam que a inflamação pulpar pode ser causada pela falha na adesão do sistema adesivo à superfície dentinária, o que causaria uma micro infiltração bacteriana nessa área. Bactérias, como o *Streptococcus mutans*, podem causar uma inflamação no tecido pulpar, devido à indução da produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α pelos macrófagos, fazendo com que haja migração de células inflamatórias e estimulação da atividade fagocitária (BERGENHOLZ, 2000; COX et al., 1996; LYGRE; VORLAND; HOLMSEN, 2001).

A resposta inflamatória inicial à cárie é caracterizada por acúmulo de células inflamatórias, mediada inicialmente por odontoblastos e, posteriormente, por células dendríticas (DURAND et al., 2006; VEERAYUTTHWILAI et al., 2007). Dados mais recentes sugerem que os odontoblastos estão envolvidos na iniciação, desenvolvimento e manutenção da resposta imune na polpa, desencadeada por bactérias orais (STAQUET et al., 2008).

Diversos trabalhos descrevem a importância dos odontoblastos na estimulação da resposta inflamatória pulpar por meio da liberação de citocinas (COOPER; HOLDER; SMITH, 2014; HAHN; BEST; TEW, 2000; MACIEL et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2004; YEE et al., 2014; ZEHNDER et al., 2003).

Quando os odontoblastos são estimulados *in vitro* com lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, são observados altos níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1- β revelando a habilidade destas células em atrair neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T (KOKKAS et al., 2007; PEZELJ-RIBARIC et al., 2002; VEERAYUTTHWILAI et al., 2007; ZEHNDER et al., 2003). Além disso, quando essas células são estimuladas com ácido lipoteicoico (LTA) de *S.*

mutans in vitro, observa-se uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 (FARGES et al., 2011).

A detecção de patógenos é efetuada, em geral por receptores específicos, designados como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, *pattern recognition receptors*) (JANEWAY Jr.; MEDZHITOV, 2002). Tais receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) nos organismos invasores.

O LTA de *S. mutans* também é descrito como o principal responsável pela produção de TNF- α por macrófagos (SEO; MICHALEK; NAHM, 2008), além de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em monócitos humanos, as quais atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares, regulando fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória (KELLER et al., 1992; LEVY et al., 1990; OSHIMA et al., 1995).

Uma das classes de moléculas de reconhecimento de padrões é a família de receptores *Toll-like* (TLR) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). Estudos demonstraram que a expressão pelos odontoblastos de TLR2, TLR3, TLR5 e TLR9 se torna aumentada em resposta ao LTA (DURAND et al., 2006).

Depois que os odontoblastos são estimulados pelo *S. mutans*, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos são produzidos, recrutando e ativando células inflamatórias do sangue, dentre elas as células dendríticas (DCs) e os monócitos (MANTOVANI et al., 2004; VIOLA; LUSTER, 2008; YOSHIE; IMAI; NOMIYAMA, 2001). As citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , são importantes no processo de inflamação pulpar por *S. mutans* (CAVALCANTI et al., 2011; CHANG et al., 2006; LERTCHIRAKARN; BIRNER; MESSER, 1998; LU et al., 2002; SILVA et al., 2009; YANG et al., 2012).

Vários estudos têm demonstrado a expressão das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-1 α , IL-1 β , CCL2 (MCP-1), TNF e IL-10 no tecido pulpar inflamado em decorrência da exposição das células da polpa à diferentes agentes bacterianos (HAHN; BEST; TEW, 2000; LU et al., 2002; ZEHNDER et al., 2003).

Patel et al. (2009) mostraram que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β são secretadas por células da polpa estimuladas *in vitro* por *S. mutans*. Resultados semelhantes foram encontrados por Horst et al. (2011) que demonstraram que estas citocinas juntamente com a IL-1 α são secretadas por odontoblastos *in vitro*, quando

estimulados com proteínas bacterianas incluindo proteínas de *S. mutans* e de outras bactérias Gram-positivas.

O *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva, que apresenta em sua parede bacteriana o LTA, um ligante para PRR dos odontoblastos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Possui ainda outros fatores de virulência, como adesinas da família SpaP, também chamadas de Antígeno I/II (Agl/II), que permitem ao microrganismo se ligar especificamente a componentes da película adquirida do dente (HAHN; BEST; TEW, 2000; JENKINSON; LAMONT, 2005; LI; WANG; LAI, 2009; YOSHIMURA et al., 1999). O LTA estimula a produção de citocinas por macrófagos e a ativação do sistema do complemento (BHAKDI et al., 1991; WANG et al., 2001). Pode ser encontrado na maior parte de sua parede celular e é um antígeno estimulador da resposta imunoinflamatória (HONG et al., 2014).

O LTA do *S. mutans* se liga preferencialmente a receptores tipo-toll 2 (TLR2), ativando a via do fator nuclear kB (NF-kB) que regula a produção de citocinas. Essa ativação promove a secreção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-8, TNF- α e IL-12 por células imunocompetentes da polpa, como macrófagos e células dendríticas (ENGELS-DEUTSCH et al., 2003; HAHN; BEST; TEW et al., 2000; HONG et al., 2014). Além disso, LTA de *S. mutans* pode induzir apoptose em algumas células, via caspase 1 (HIRAO et al., 2009). O LTA também é capaz de induzir a síntese de óxido nítrico por macrófagos ativados *in vitro* e a secreção de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-6 (BHAKDI et al., 1991; KELLER et al., 1992; STANDIFORD et al., 1994).

Estudos em cultura de monócitos mostraram que o LTA de *S. mutans* pode provocar a indução da secreção de TNF- α e IL-1 β (MANCUSO et al., 1994) e também de IL-12 (CLEVELAND et al., 1996), estimulando a resposta inflamatória.

De fato, vários estudos descreveram a grande relevância do LTA em induzir resposta inflamatória, já sendo demonstrado que muitas das características clínicas observadas durante a sepse causada por bactérias gram-positivas foram relacionadas às potentes propriedades inflamatórias de LTA (BHAKDI et al., 1991; KELLER et al., 1992; KELLER; GEHRI; KEIST, 1994; SUDA et al., 1995).

Em contrapartida, um único estudo demonstrou que o LTA, apesar de ser comumente considerado como um fator de virulência, também pode ser capaz de suprimir a resposta imune através da inibição da secreção da citocina IL-2, um importante fator de crescimento autócrino de linfócitos T (PLITNICK et al., 2001).

Plitnick et al. (1998) demonstraram que o *S. mutans* foi capaz de estimular *in vitro* a proliferação de células mononucleares de sangue periférico (CMSP), incluindo linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e células *Natural Killer* (NK). Estas células secretaram principalmente as citocinas IFN- γ , linfotóxina (TNF- β) e IL-10.

Um estudo semelhante avaliou *in vitro* o perfil de citocinas produzidas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) quando estimuladas por bactérias cariogênicas, incluindo *S. mutans*. Neste estudo, foi também observada indução da secreção de IFN- γ e IL-10 enquanto que os níveis de IL-4 e IL-2 foram muito baixos ou não detectáveis (HAHN et al., 2000).

Jiang et al. (2017) demonstraram que *S. mutans* induz fortemente a secreção das quimiocinas IL-8 e proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), que poderiam contribuir para o recrutamento de neutrófilos ou monócitos *in vivo*. A secreção dessas citocinas quimioatrativas por CMSP pode auxiliar o desenvolvimento da resposta inflamatória frente a infecções endodônticas, estimulando o recrutamento de leucócitos.

Também já foi descrito que *S. mutans*, em infecções cariogênicas, pode ter acesso à corrente sanguínea e estar associado a doenças cardiovasculares. De fato, foi demonstrado recentemente que *S. mutans* é capaz de estimular células endoteliais aórticas humanas (HAECs) a secretarem IL-6, IL-8 e MCP-1 *in vitro* (NAGATA; OHO; 2017).

Além disso, outros estudos mostraram que o antígeno I/II de *S. mutans*, uma adesina para superfícies revestidas com saliva, interage diretamente com monócitos humanos, células epiteliais e endoteliais, através da ligação de lectina, e estimularam a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (SOELL et al., 1994; VERNIER et al., 1996).

Mais recentemente, Chia et al. (2002) mostraram que as enzimas glicosiltransferases (Gtf) C e D de *S. mutans* foram capazes de estimular predominantemente a secreção de IL-6 a partir de linfócitos T cultivados *in vitro*. Além disso, também já foi demonstrado que o peptídeo sintético da enzima glicosiltransferase de *S. mutans* GTF-I (1301-1322) é capaz de ativar *in vitro* linfócitos T CD4 obtidos de CMSP de indivíduos naturalmente sensibilizados, estimulando a secreção das citocinas INF- γ e IL-13, evidenciando a importância das respostas do tipo 1 e do tipo 2 dos linfócitos T auxiliares (ROA; GÓMEZ; RODRIGUEZ, 2008).

Outros pesquisadores estimularam células mononucleares do sangue periférico de indivíduos que apresentavam ulcerações aftosas recorrentes (UAR) tanto com *S. mutans* quanto com a enzima glicosiltransferase (GtfD) desta bactéria. Neste estudo foi observado um aumento significativo na proliferação das células estimuladas, sugerindo que o *S. mutans* pode estar envolvido no desenvolvimento de UAR severa causando inflamação (SUN; CHIA; CHIANG, 2002).

Além disso, já foi descrito que o polissacarídeo do sorotipo f (poli f) de *S. mutans* é capaz de estimular monócitos humanos *in vitro* induzindo a produção de TNF- α e IL-1 de forma dose-dependente. Estes resultados indicam que este polissacarídeo pode aumentar a expressão dos receptores Fc para a imunoglobulina G (IgG), causando um aumento da fagocitose e indução da liberação de TNF- α e IL-1 por monócitos (BENABDELMOUMENE et al., 1991).

3 HIPÓTESES

As hipóteses a serem testadas são:

- a) diferentes cerâmicas odontológicas interferem de modo distinto na transmissão de luz para polimerização de cimentos resinosos duais, afetando o grau de conversão dos monômeros resinosos;
- b) cimentos resinosos são diferentemente sensíveis a interferência das cerâmicas na luz incidida, quanto à polimerização;
- c) cimentos resinosos liberam substâncias nas primeiras 24 horas capazes de alterar a viabilidade e a produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) humano, tanto na presença quanto na ausência de estimulação com *Streptococcus mutans*;
- d) diferentes cimentos resinosos afetam de modo distinto a viabilidade e a produção de citocinas por CMSP humano, tanto na presença quanto na ausência de estimulação com *Streptococcus mutans*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes materiais cerâmicos na transmissão de luz para polimerização de cimentos resinosos e os efeitos de substâncias liberadas a partir destes cimentos na atividade de células imunocompetentes estimuladas com bactérias cariogênicas.

4.2 Objetivos específicos

- a) quantificar e comparar a intensidade de luz transmitida através das cerâmicas leucita-fluorapatita, di-silicato de lítio, CAD/CAM e cerômero;
- b) determinar e comparar o grau de conversão dos monômeros resinosos presentes nos cimentos resinosos duais, RelyXTM U200 (3M/ESPE®) e RelyXTM Ultimate (3M/ESPE®) seT PP (SDI) e Multlink Speed (Ivoclar Vivadent®), após fotopolimerização através das cerâmicas de di-silicato de lítio e leucita-fluorapatita;
- c) determinar e comparar a citotoxicidade de substâncias liberadas pelos cimentos resinosos duais Multlink Speed, seT PP e RelyXTM U200 em células mononucleares de sangue periférico estimuladas ou não com *Streptococcus mutans*;
- d) avaliar e comparar o efeito de substâncias liberadas pelos cimentos Multlink Speed, seT PP e RelyXTM U200 nas frequências de monócitos produtores das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α , com ou sem estimulação com *Streptococcus mutans*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos corpos de prova de cerâmica

Nesse estudo foram utilizados quatro tipos de materiais cerâmicos odontológicos: a) Vidro amorfo: cerâmica leucita-fluorapatita IPS d.SIGN® (Ivoclar Vivadent®); b) Vidro parcialmente cristalino: cerâmica injetada de di-silicato de lítio IPS e.max® (Ivoclar Vivadent®); c) Vidro parcialmente cristalino: cerâmica obtida pelo processo CAD-CAM, IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent®); d) Cerômero: Lava™ Ultimate (3M/ESPE®).

Foram confeccionados em laboratório discos dos materiais cerâmicos, com 11 mm de diâmetro e 2 mm de altura, conforme instruções dos fabricantes. Para uniformizar a confecção dos discos foi utilizada uma matriz de silicone. Os discos foram mantidos individualmente em frascos plásticos estéreis até o momento de utilização nos ensaios.

5.2 Análise de transmitância de luz através de cerâmicas

Para avaliar a transmitância das amostras de cerâmica foi utilizado radiômetro (LED RADIOMETER, SDI, Austrália) para medir a quantidade luz emitida pelo fotopolimerizador (Radiic, SDI) que atravessa os discos de cerâmica. Para cada cerâmica foram feitas cinco medições com 20 segundo de intervalo entre as medições. Os dados foram obtidos no espectro de absorção da canforoquinona, que é o fotoiniciador presente nos cimentos resinosos, nos comprimentos de onda de 468 a 470 nm, com pico máximo de absorção de 468 nm (ASMUSSEN; PEUTZFELDT, 2002), e expressos em percentagem de luz transmitida.

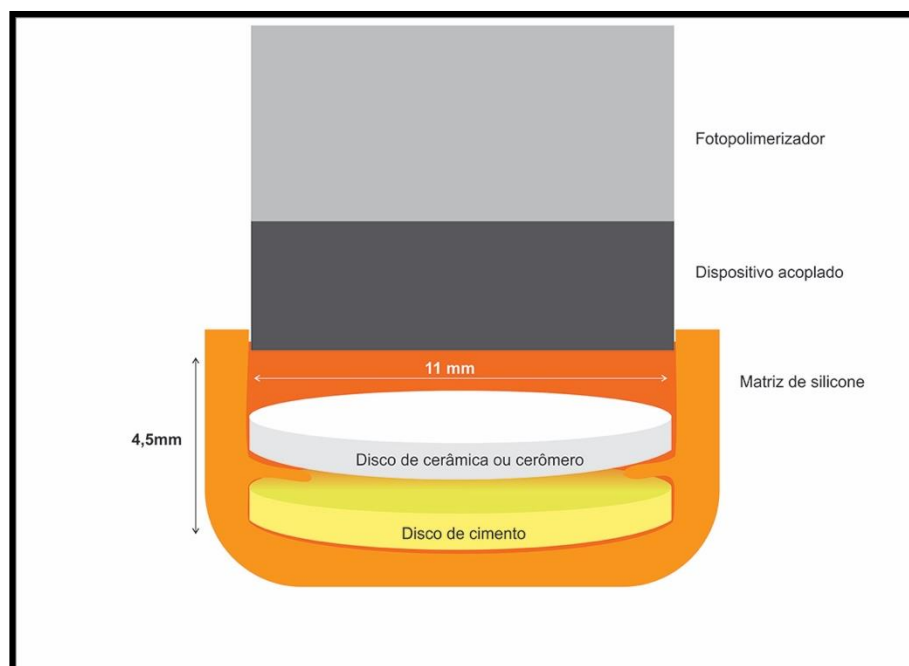
5.3 Preparo dos discos de cimento resinoso

Para análise do grau de conversão dos monômeros, foram confeccionados com auxílio de molde de silicone adaptado para sobreposição de disco de cerâmica, discos dos seguintes cimentos resinosos: cimento resinoso dual RelyX™ Ultimate (3M/ESPE®); cimentos resinosos auto-condicionantes duais Multilink Speed (Ivoclar Vivadent®), seT PP (SDI) e RelyX™ U200 (3M/ESPE®).

As pastas base e ativadora dos cimentos foram dispensadas em bloco de papel (3 mm de comprimento), manipuladas com espátula metálica por 20 segundos, e aplicadas na parte inferior da matriz de silicone (Fig. 1), para obtenção de discos com 1 mm de altura e 11 mm de diâmetro. Em seguida um disco de cerâmica de di-silicato de lítio IPS e.max® (Ivoclar Vivadent®) ou um disco de cerâmica leucita-fluorapatita IPS d.SIGN® (Ivoclar Vivadent®) foi posicionado no compartimento superior, sem, contudo, tocar no cimento. A ponta de um aparelho fotopolimerizador de LED (Radiic, SDI, Austrália) foi acoplada à borda da matriz de silicone e a luz emitida, conforme instruções do fabricante, de modo que não houvesse dispersão de luz (Fig. 1). Os corpos de prova foram polimerizados a mesma distância e com a mesma intensidade de 1350 mW/cm^2 , por 40 segundos, com densidade de energia de 54J. A intensidade de luz do fotopolimerizador foi aferida por meio de radiômetro (LED RADIOMETER, SDI, Austrália) entre cada grupo de cimento analisado. Foram confeccionados 5 discos de cada cimento resinoso.

Os grupos controle positivo para cada cimento fotopolimerizável foram obtidos por meio da aplicação do cimento na parte inferior da matriz de silicone, seguida da aplicação de luz (LED) por 40 segundos, diretamente sobre o cimento resinoso sem a presença do disco de cerâmica (n=5). Como controle negativo, para cada cimento dual foram confeccionados 5 discos por meio de aplicação do cimento na parte inferior da matriz de silicone e colocação de disco de cerâmica IPS e.max® (Ivoclar Vivadent®) na porção superior da matriz, sem aplicação de luz, por 5 minutos. O controle negativo permite quantificar a conversão de monômeros de cada cimento dual, sem ativação dos fotoiniciadores, para verificar a contribuição dos sistemas quimiopolimerizáveis desses cimentos na polimerização total da resina.

Figura 1: Esquema de preparação dos discos de cimentos resinosos em matriz de silicone contendo dois compartimentos.



Fonte: Elaborado pelo autor

Após procedimentos de polimerização, foram obtidos 5 discos de cada condição de polimerização (luz direta, luz através da cerâmica e ausência de luz) para cada um dos quatro tipos de cimento analisados.

5.4 Avaliação do grau de conversão de monômeros por espectroscopia infravermelho de Fourier (FTIR)

Imediatamente após polimerização, os discos de cimentos resinosos foram retirados da matriz de silicone e submetidos à técnica de espectroscopia infravermelho transformada de Fourier (FTIR), capaz de avaliar o grau de conversão das espécies químicas do cimento resinoso.

O grau de conversão (GC) levou em consideração a variação da intensidade de absorção da radiação do FTIR de dois grupos químicos: metacrilato e hidrocarboneto aromático, em função do tempo, devido a reação de polimerização do grupo metacrilato. Para o cálculo do GC foi utilizada a seguinte equação matemática: $GC = [1 - (R_{\text{polimerizado}}/R_{\text{não polimerizado}})] \times 100$, onde $R_{\text{polimerizado}}$ = intensidade da radiação absorvida em 1717 cm^{-1} (metacrilato

polimerizado) e R não polimerizado = intensidade da radiação absorvida 1608 cm^{-1} (hidrocarboneto não polimerizado) (PIANELLI et al., 1999).

No espectroscópio FTIR (SHIMADZU, IRAFFINITY 1, Japão) com módulo ATR com cristal de sulfeto de zinco, foram realizadas as leituras da intensidade da radiação absorvida de cinco amostras de cada cimento resinoso nos tempos de polimerização: 5 minutos, 10 minutos e 24 horas, após a espatulação.

5.5 Preparo dos sobrenadantes de cimentos resinosos

Para esta etapa do estudo foram utilizados os cimentos resinosos de polimerização dupla: Multilink Speed (Ivoclar) (MULT), seT PP (SDI) (SET) e RelyX™ U200 (3M/ESPE®) (U200). Foram confeccionados discos de cimentos de 11 mm de diâmetro por 1 mm de altura, utilizando-se molde de silicone estéril adaptado para sobreposição de disco de cerâmica. Os cimentos foram aplicados na parte inferior da matriz de silicone e um disco de cerâmica de di-silicato de lítio (e.max®, Ivoclar Vivadent) de 2 mm de espessura foi posicionado sobre a matriz sem tocar no cimento. Os cimentos foram polimerizados em ambiente estéril, por luz de LED (Radical, SDI, Austrália) com intensidade de 1350 mW/cm^2 , por 40 segundos, com densidade de energia de 54 Joules. Após fotopolimerização, os discos de cimento resinoso foram colocados em placa de fundo chato de 24 poços e mergulhados em 1,5mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) contendo 100 UI/mL de penicilina G potássica e 100 µg/mL de estreptomicina. Após 24 horas de incubação em estufa úmida, a 37°C, 5% CO₂, os sobrenadantes contendo substâncias liberadas dos cimentos resinosos foram recolhidos e congelados a -80°C para utilização nos experimentos.

5.6 Preparo das bactérias

Amostra de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi cultivada em Tryptic Soy Agar (TSA - Difco, Sparks, MD, EUA) enriquecido com 5% de sangue de carneiro, em microaerofilia, a 37°C por 48 horas. Em seguida, as bactérias foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio-salina (PBS) (1500 X g, 10 minutos). A concentração de bactérias em suspensão foi determinada em espectrofotômetro (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Biochrom, Cambridge, UK), no comprimento de

onda OD650. Para utilização nos experimentos, as bactérias foram inativadas por aquecimento a 100°C por 10 minutos e ressuspensas em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (Sigma Aldrich).

5.7 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas (CAAE: 78981517.4.0000.5137) e conduzido de acordo com as normas vigentes (ANEXO A). Foram coletados 10 mL de sangue de dez doadores voluntários saudáveis em tubos contendo heparina (Becton Dickinson Vacutainer®, USA). Os critérios de exclusão foram: portadores de doença infecciosa sistêmica, indivíduos imunodeficientes e usuários de medicação capaz de interferir na resposta imunoinflamatória, como antiinflamatórios e drogas imunossupressoras. Para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP), o sangue foi diluído em tampão fosfato-salina (PBS) na proporção 1:1 e aplicado sobre 10 mL de Ficoll-Paque (Pharmacia). Após centrifugação a 200 X g, por 40 minutos, à 20°C, para a formação do gradiente de densidade, as CMSP foram recolhidas, lavadas três vezes com PBS (200 X g, 10 minutos, 4°C) e ressuspensas em meio completo (RPMI acrescido de 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina G potássica e 100 µg/mL de estreptomicina e 5% de soro humano normal).

5.8 Ensaio de MTT

Para avaliar a citotoxicidade dos produtos liberados pelos cimentos resinosos, 2×10^5 CMSP foram transferidas para cada poço de placa de 96 poços de fundo chato e adicionados sobrenadantes de MULT, SET ou U200 nas diluições finais de 1:3 e 1:4 em meio RPMI completo. Após 20 horas em estufa úmida a 37°C, 5% CO₂, as células foram submetidas ao teste colorimétrico de avaliação funcional para analisar a atividade mitocondrial. Como controle negativo células foram aquecidas a 100°C por 15 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Foi adicionado metil tetrazol (MTT, 2,5 mg/mL), em concentração final de 10%v/v, e as células incubadas por mais 4 horas a 37°C, 5% CO₂. Os precipitados de formazan foram dissolvidos com adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e, após homogeneização, foi realizada leitura em comprimento de onda de 575 nm

(Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os dados foram expressos em percentagem de células viáveis em relação ao controle (CMSP com RPMI apenas).

5.9 Estimulação das CMSP para avaliação da morte celular e das citocinas

Para verificar o efeito das substâncias liberadas pelos cimentos resinosos na morte celular e produção de citocinas por monócitos, $2,5 \times 10^5$ CMSP foram adicionadas em cada poço de placa de 96 poções de fundo em “U” e incubadas por 1 hora em estufa a 37°C, 5% CO₂. Em seguida, foram adicionados sobrenadantes dos cimentos resinosos MULT, SET ou U200 na diluição de 1:4 e realizada incubação por mais 7 horas em estufa de CO₂. Para verificar o efeito de substâncias liberadas pelos materiais na produção de citocinas por CMSP estimuladas por bactérias cariogênicas, as células foram previamente incubadas com *Streptococcus mutans* (Sm) na proporção de 1:1, durante 1 hora, em estufa a 37°C, 5% CO₂. Em seguida, foram adicionados sobrenadante dos cimentos resinosos na diluição de 1:4 e realizada incubação por mais 7 horas. No grupo controle negativo, as CMSP receberam apenas meio RPMI completo (Controle) e no grupo controle positivo (Sm), as CMSP foram incubadas apenas com *S. mutans*. Quatro horas antes do término da incubação, foi adicionada Brefeldina A (1 µg/mL) (E Biociensce, San Diego, CA, USA), a qual bloqueia a secreção de proteínas, concentrando as citocinas no complexo de Golgi das células.

Dessa forma, foram obtidas oito condições experimentais para CMSP de cada indivíduo doador: Controle (apenas RPMI), MULT, SET, U200, Sm (*S. mutans*), Sm-MULT, Sm-SET, Sm-U200.

5.10 Quantificação de células apoptóticas e necróticas

Para verificar o efeito das substâncias liberadas pelos cimentos resinosos na apoptose e necrose celular, 3×10^5 CMSP de cada condição experimental citada anteriormente foram submetidas a marcação com Kit de detecção de apoptose Anexina V com 7-AAD (BioLegend, San Diego, CA, USA). Para isso, as células foram lavadas 2 vezes com Cell Staining Buffer por meio de centrifugação (8 minutos, 200 x g, 4°C), ressuspensas com 100 µL de Annexin V Binding Buffer. Foram adicionados anticorpo monoclonal anti-CD14 bv421 (BioLegend), Anexina V

APC e 7-amino-actinomicina D (7-AAD) e as células incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo.

5.11 Reações de imunofluorescência para detecção de citocinas

As reações de imunofluorescência foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Souza et al. (2005). Para identificação fenotípica de monócitos, as células foram centrifugadas (8 minutos, 200 X g, 4°C) e incubadas por 15 minutos, à 4°C, com solução de anticorpo monoclonal anti-CD14 (clone M5E2, BioLegend), diluído em PBS 0,015M, pH 7,4, com 0,01% de azida e 0,2% de albumina bovina sérica (BSA). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de formaldeído 2% em PBS, por 20 minutos à temperatura ambiente. Para marcação intracitoplasmática de citocinas, as células foram permeabilizadas com saponina 0,5% (SigmaAldrich) por 10 minutos e incubadas com anticorpos monoclonais anti-IL-1 α por 10 minutos e inBioLegend), IL-6 (clone MQ2-13A5, BioLegend), IL-8 (clone BH0814, BioLegend), IL-10 (clone JES3-9D7, BioLegend), IL-12 (clone C115, BioLegend) e TNF- α (clone MAb11, BioLegend), por 30 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens com solução de saponina, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo.

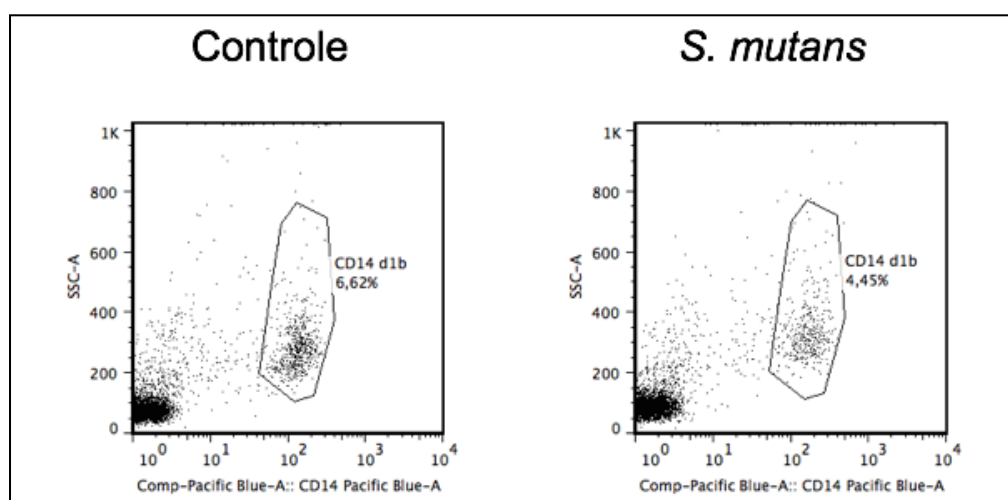
5.12 Citometria de fluxo

As células marcadas foram analisadas por citômetro de fluxo (FACSCanto™II, Becton Dickinson, New Jersey, USA). Para cada grupo experimental foram avaliadas cerca de 70.000 células. Os dados citométricos foram analisados por meio do software FlowJo 7.6.5 (Tree Star Inc., USA).

Para análise de apoptose, foram selecionadas a população total de CMSP e a população de monócitos CD14⁺ nos gráficos de granulosidade. Foram consideradas apoptóticas as células 7AAD⁻Anexina⁺; em apoptose tardia ou necróticas as células 7AAD⁺Anexina⁺; e viáveis as células 7AAD⁻Anexina⁻. Os resultados foram expressos em percentagem de células dentro da população total de CMSO e dentro da população de monócitos CD14⁺.

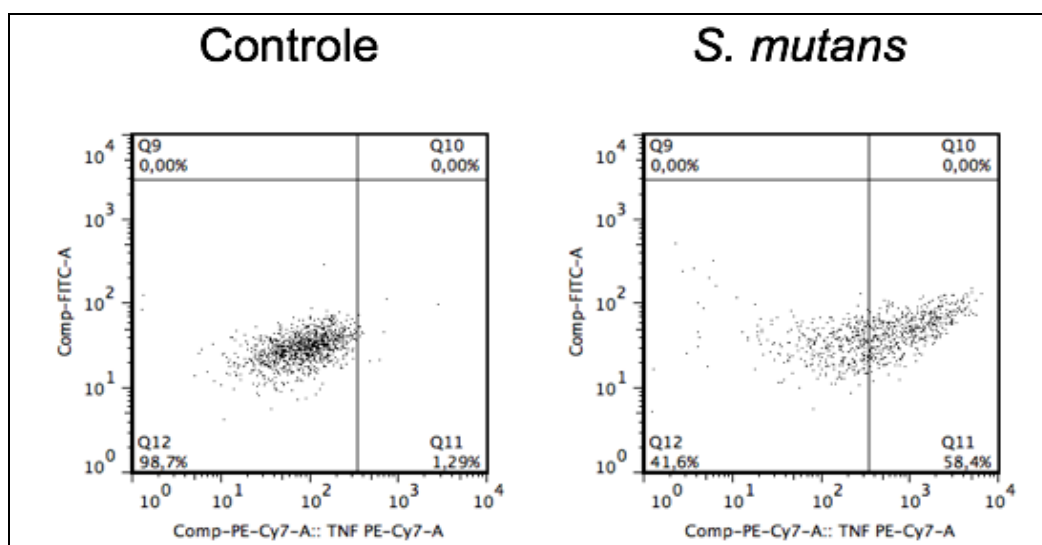
Para as análises de citocinas, foram selecionadas as populações de células monocíticas positivas para CD14 nos gráficos de granulocidade (Fig. 2). Em seguida foram determinadas as percentagens de células expressando cada uma das citocinas avaliadas dentro da população de monócitos CD14⁺ (Fig. 3).

Figura 2: Gráfico Dotplot granulocidade versus CD14, mostrando a população de monócitos CD14⁺ selecionada nos grupos Controle e *S. mutans* (Sm).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3: Gráfico Dotplot mostrando a percentagem de células produtoras de TNF- α dentro da população de monócitos CD14⁺ nos grupos Controle e *S. mutans* (Sm).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.13 Análises estatísticas

O teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov mostrou distribuição normal dos dados. Para verificar a existência de diferenças entre os materiais na análise de transmitância das cerâmicas, no grau de conversão de monômeros, na viabilidade celular e na expressão de citocinas foi utilizado o teste ANOVA um critério sem repetição, seguido pelo teste "post hoc" de Tukey para comparação entre pares, com nível de significância de 5%. Para verificar a existência de diferenças no grau de conversão entre as formas de polimerização dos cimentos e entre os diferentes tempos foi utilizado o teste ANOVA dois critérios com repetição, seguido pelo teste "post hoc" de Tukey, com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

6 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Com o objetivo de estudar o efeito de diferentes materiais cerâmicos na transmissão de luz para polimerização de cimentos resinosos, foram realizadas análises de transmitância de discos de cerâmica e determinação do grau de conversão de monômeros resinosos de diferentes cimentos, em diferentes tempos. Os resultados das análises físico-químicas foram compilados na forma de artigo científico intitulado **“Leucite-fluorapatite ceramics and lithium di-silicate affect differently the direct light transmittance and the degree of conversion of monomers of different dual resin cements”**, que será submetido à análise no periódico **The Journal of Prosthetic Dentistry (Qualis A2)**.

As normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico: https://www.elsevier.com/___data/promis_misc/jpd-author-guidelines-portuguese-2013.pdf

Leucite-fluorapatite ceramics and lithium di-silicate affect differently the direct light transmittance and the degree of conversion of monomers of different dual resin cements

Senna Figueiredo Azevedo^a, Marcus Vinicius Tolentino^b, Alberto Nogueira da Gama

Antunes^a, Martinho Campolina Rebello Horta^a, Paulo Eduardo Alencar Souza^a

^a the Post-Graduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^b Department of Chemistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author:

Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Departamento de Odontologia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

Av. Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101 - Coração Eucarístico

CEP 30535-901 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Telefone: +55 31 3319-4414 - E-mail: pauloalencar@pucminas.br.

SUMMARY

Introduction: Dual resin cements are photopolymerized through ceramics, which can attenuate light transmission, affect polymerization and interfere with the clinical properties and longevity of the restorations. Different cements may exhibit different sensitivity to ceramic light attenuation. The objective of this study was to evaluate the attenuation of light through different ceramics and verify the effect on the degree of conversion of monomers of different resin cements.

Materials and Methods: Five discs were made for each ceramic: IPS d.SIGN®, e.max® and e.max® CAD (Ivoclar Vivadent®); and Lava™ Ultimate (3M/ESPE®). The light from the photopolymerizer transmitted through the ceramics was quantified by a radiometer. Then, the RelyX™ Ultimate and RelyX™ U200 (3M/ESPE®), Multilink Speed (Ivoclar Vivadent®) and seT PP (SDI) resin cements were photopolymerized through the leucita-fluorapatite IPS d.SIGN® and lithium di-silicate e.max® and the degree of conversion (DC) of monomers was determined by FTIR spectroscopy after 5 minutes, 10 minutes and 24 hours.

Results: d.SIGN presented the lowest transmittance of light and Lava Ultimate the highest transmittance when compared to the other ceramics. The Multilink, Ultimate and U200 DC after 24 hours were higher when photopolymerized through e.max® than d.SIGN®, although seT PP showed an opposite result. Comparison between cements showed that U200 had lower DC when polymerized through d.SIGN® and the higher DC when polymerized through e.max® after 5 minutes, while seT PP had the highest DC when polymerized through d.SIGN® and the lowest DC when through e.max® after 24 hours.

Conclusion: Our data show that the sensitivity to reduction of light transmittance by the ceramic for the conversion of monomers varies between different resin cements at different times. Polymerization kinetics are also affected. These interferences should be clinically evaluated to avoid damage to the longevity of dental ceramic restorations.

Keywords: Resin cement, resinous monomers, dental ceramics, degree of conversion.

INTRODUCTION

Resin cements are widely used to cement ceramic restorations. These cements can be polymerized by chemical reaction, by means of light or chemical and double (dual) polymerization (Rueggeberg & Craig, 1988).

Dual resin cements have been developed to combine the advantages of chemical activation and light activation characteristics, and can be used in deep areas where there is a reduction in light penetration (van Meerbeek et al., 1994). In dual cements the polymerization kinetics involves two distinct mechanisms: light-induced polymerization and effective chemical polymerization to the places where the light can not reach. In these situations, the light intensity that reaches the cement is enough to initiate the process of physical polymerization. Chemical polymerization, through a catalyst, is necessary to achieve a maximum degree of conversion of the monomers. However, many studies have reported that most of these dual-polymer cements are extremely light dependent and chemical polymerization alone is not capable of promoting adequate polymerization of these materials (Papazoglou et al., 2006; Arrais et al., 2008; Meng et al., 2008).

The number of free radicals and the proportion in which they are formed are the most important factors in the polymerization reaction (Rueggeberg et al., 1999), because the degree of conversion of polymers of a composite depends on the formation of these molecules. The degree of conversion represents in percent the amount of unsaturated (double covalent) carbon bonds converted into saturated (simple covalent) bonds (Park, 1996; Anusavice, 2003). In the literature, there is a consensus that a high degree of conversion (between 65-75%) is essential to optimize mechanical properties (Ferracane, 1985; Rueggeberg & Craig, 1988; Rueggeberg et al., 1994), biocompatibility (Bagis & Rueggeberg, 2000) and color stability (Ruyter et al., 1987; Moraes et al., 2009).

Incomplete polymerization results in increased water absorption, decreased surface hardness, decreased compressive strength, and decreased bond strength between the cement and substrate, causing an increase in the rate of degradation in the cementation line due to the acidity present in the oral cavity biofilm (Moraes et al., 2009; Silva et al., 2013). This degradation of the cement line at the margins of the restorations may compromise restoration integrity, either by loss of marginal sealing, fracture or secondary caries (D'Arcangelo et al., 2014).

In general, the chemical activation of the dual cements does not appear to compensate for the absence of light in thick or opaque restorations even after 24 hours after the initiation of the polymerization reaction (Hasegawa et al., 1991; Rueggeberg et al., 1994; Uctasli et al., 1994; Acquaviva et al., 2009). In addition, the light transmission can be attenuated through the ceramic due to light absorption and reflection phenomena interfering directly in the polymerization of the underlying cement, which may compromise the physicochemical properties of the cement and consequently the durability of the restoration and the adhesive interface (Watts & Cash, 1994; Braga et al., 2002; Pisani-Proenca et al., 2006; Giannini et al., 2014).

The amount of transmitted, reflected or scattered light is determined by the optical behavior of the material and depends on its microstructural and morphological characteristics, thickness and incident light (Heffernan et al., 2002). Thus, each type of ceramic used to make an indirect restoration will exhibit a distinct behavior against incident light (Giannini et al., 2014).

The objective of this study was to quantify and compare the intensity of light transmitted through the leucite-fluorapatite, lithium di-silicate and ceromer ceramics and to compare the degree of monomer conversion of different dual resin cements, after photopolymerization using lithium di-silicate, leucite-fluorapatite and ceramics ceramics.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining of ceramic specimens

In this study four types of dental ceramic materials were used: a) amorphous glass: leucite-fluorapatite ceramics IPS d.SIGN® (Ivoclar Vivadent®); b) partially crystalline glass: injected ceramics of lithium di-silicate IPS e.max® (Ivoclar Vivadent®); c) partially crystalline glass: ceramics obtained by the CAD-CAM process, IPS e.max® CAD (Ivoclar Vivadent®); d) Ceramic: Lava™ Ultimate (3M/ESPE®).

Ceramic discs were made in the laboratory, 11 mm in diameter and 2 mm high, according to the manufacturer's instructions. A silicone matrix was used to standardize the disks. The disks were individually held in sterile plastic bottles until the time of use in the tests.

Analysis of transmittance of ceramics

To evaluate the transmittance of the ceramic samples, a radiometer (LED RADIOMETER, SDI, Australia) was used to measure the amount of light emitted by the photopolymerizer (Radiic, SDI) through the ceramic discs. Five measurements were made for each ceramic. The data were obtained in the absorption spectrum of camphorquinone, which is the photoinitiator present in resin cements, at wavelengths of 400 to 500 nm, with a maximum absorption peak of 468 nm (Asmussen & Peutzfeldt, 2002), and expressed as a percentage transmitted light.

Preparation of resin cement discs

For the analysis of the degree of conversion of the monomers, the following resin cements were prepared using a silicone mold adapted for ceramic disc overlays: RelyX™ Ultimate dual resin cement (3M/ESPE®) (Ultimate); Multilink Speed (Ivoclar Vivadent®)

(MULT), seT PP (SDI) (SET) and RelyXTM U200 (3M/ESPE®) (U200) dual polymerization self-etching resins.

The base and catalyst paste of the cements were dispensed in a paper block (3 mm long), manipulated with a metal spatula for 20 seconds, and applied to the bottom of the silicon matrix to obtain 1 mm high and 11 mm of diameter. Then an IPS e.max® lithium disilicate ceramic disk (Ivoclar Vivadent®) or an IPS d.SIGN® (Ivoclar Vivadent®) leucite-fluorapatite ceramic disk was placed in the upper compartment, without, however, touch the cement. The tip of an LED light curing device (Radiic, SDI, Australia) was coupled to the edge of the silicone matrix and the light emitted, according to the manufacturer's instructions, so that there was no light scattering. The specimens were polymerized at the same distance and with the same intensity of 1350 mW/cm², for 40 seconds, with energy density of 54J. The light intensity of the photopolymerizer was measured by radiometer (LED RADIOMETER, SDI, Australia) for each group of cement analyzed. Five disks were made for each resin cement.

The positive control groups for each photopolymerizable cement were obtained by applying the cement to the bottom of the silicon matrix, followed by the application of light (LED) for 40 seconds, directly on the resin cement without the presence of the ceramic disc (n = 5). As a negative control, five discs were prepared by applying the cement to the lower part of the silicon matrix and placing the IPS e.max® ceramic disc (Ivoclar Vivadent®) in the upper portion of the matrix, without the application of light for 5 minutes. The negative control allows to quantify the conversion of monomers of each dual cement, without activation of the photoinitiators, to verify the contribution of the chemical activation systems of these cements in the total polymerization of the resin.

After polymerization procedures, five disks of each polymerization condition were obtained (direct light, light through the ceramic and absence of light) for each of the four types of cement analyzed.

Evaluation of the degree of conversion of monomers by Fourier infrared spectroscopy (FTIR)

Immediately after polymerization, the discs of resin cements were removed from the silicon matrix and subjected to the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) technique. In order to calculate the degree of conversion (DC), the mathematical equation was used, according to Pianelli et al. (1999): $DC = [1 - (R_{pol}/R_{non-pol})] \times 100$, where R_{pol} = intensity of radiation absorbed at 1717cm^{-1} (polymerized methacrylate) and $R_{not\ pol}$ = intensity of radiation absorbed 1608 cm^{-1} (unpolymerized hydrocarbon).

In the FTIR spectroscope (SHIMADZU, IRAFFINITY 1, Japan), the intensity of the radiation absorbed from five samples of each resin cement at the times: 5 minutes, 10 minutes and 24 hours, after spatulation, were measured.

Statistical analyzes

The Kolmogorov-Smirnov normality test showed normal distribution of the data. To verify the existence of differences between the materials in both the transmittance analysis of the ceramics and in the degree of monomer conversion, the one-way ANOVA test followed by the Tukey post hoc test were used for comparison between pairs, with level of significance of 5%. To verify the existence of differences in the degree of conversion between the polymerization forms of the cements and between the different times, the two-way ANOVA test with repeated measures followed by the Tukey's post hoc test were used, with

significance level of 5%. Analyzes were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

Transmittance analysis

Analysis of transmittance showed that the IPS d.SIGN® ceramics presented significantly lower percentage of light transmittance (3.45 ± 0.22) than the other ceramics evaluated (Fig. 1). On the other hand, Lava™ Ultimate showed a significantly higher percentage of light transmittance (18.69 ± 0.36) than the other ceramics (Fig. 1). The average percentages of light transmittance of the IPS e.max® and e.max® CAD ceramics were 17.45 ± 0.14 and 14.86 ± 0.18 , respectively, being significantly different from each other.

Analysis of the degree of conversion of resinous monomers

Analysis of monomer DC by the FTIR method showed that, for all resin cements evaluated, polymerization with LED light through the ceramic discs generated significantly higher conversion degrees when compared to polymerization in the absence of light (Tables 1, 2, 3 and 4), except for SET light-curing through d.SIGN ceramics, after 10 minutes, which presented DC similar to the polymerized group in the absence of light (Table 2).

Comparing the effect of the two ceramics, DC were significantly higher when photopolymerized through IPS e.max® than IPS d.SIGN for MULT cements after 5 minutes and 24 hours (Table 1), U200 at all evaluated times (Table 3) and Ultimate after 10 minutes and 24 hours (Table 4). Although SET showed higher DC when polymerized by IPS e.max® than by IPS d.SIGN® after 5 and 10 minutes, the opposite result was found after 24 hours (Table 2).

The degree of monomer conversion increased significantly between the times evaluated in all cements, regardless of exposure to light for polymerization and the type of ceramic used (Tables 1, 2, 3 and 4).

The positive control groups, in which the resin cements were polymerized by means of direct light without interference of the ceramic disc, obtained values of conversion degree higher than the means of the polymerized groups without light or with light through the ceramics, for all the at all times evaluated (Table 5).

When comparing the different photopolymerized resin cements through the IPS d.SIGN® ceramics, it was observed that SET and U200 presented DC significantly lower than MULT and Ultimate, after 5 minutes (Fig. 2A). However, when polymerized through IPS e.max®, U200 presented DC significantly higher than the other cements evaluated after 5 minutes (Fig. 2B). After 10 minutes, MULT showed DC significantly higher than the other cements when it was photopolymerized through IPS d.SIGN® (Fig. 2C), but exhibited DC significantly lower than the other cements when photopolymerized through IPS e.max® (Fig. 2D). The contrast was observed after 24 hours when SET exhibited DC significantly higher than the other cured photopolymerized cements by IPS d.SIGN® (Fig. 2F), but DC significantly lower than the other cured photopolymerized cements by IPS e.max® (Fig. 2F).

DISCUSSION

The degree of conversion of the resin monomers used to lute indirect materials over teeth influences the longevity of the restorative treatment. The higher is the degree of conversion the lower is the susceptibility of the resin material to the water degradation (Malacarne et al., 2006; Moraes et al., 2009). All materials tested were designed to set under light activation even with their self-polymerization mechanism. Thus the light source, its

intensity, wavelength plays a crucial role on the resin cement of the present study as the characteristics of light transmittance of the ceramic or indirect resin.

Lava Ultimate showed significantly higher light transmittance than the other ceramics. Lava™ Ultimate is an indirect resin containing an organic phase and an inorganic phase (Gianini et al., 2014). The manufacturer does not provide the exact composition of the product. Nevertheless, it can be considered as slightly resembling a composite resin for direct use, but with a much denser polymer network and a high degree of conversion value. Unlike the other ceramics, the structures of this type of indirect resin are formed by covalent bonds between monomer (C=C) with some space between each polymer chain (Della Bona & Anusavice 2002). Consequently, there are fewer obstacles for the light passage, whether transmitted or reflected. In other ceramics, the higher ordering of their atoms generates a much denser and more compact structure, becoming a barrier to the passage of light (Brodbeck et al., 1980).

The d.SIGN® presented values of light transmittance significantly lower than the other ceramic of the study. The vitreous content determines the way light is transmitted inside the ceramic. It has been shown that the higher the vitreous content, the greater the possibility of light transmission (Heffernan et al., 2002). Opaque ceramics have been developed to reproduce the optical behavior of dentin. It has less translucency and therefore acts as an obstacle to the passage of light. More opaque ceramics are formed by crystalline vitreous phases with metallic oxides that have the function of dispersing the incident light (Flinn et al., 2012; Harada et al., 2016). According to the manufacturer, d.SIGN® possesses titanium oxide, strontium oxide, zinc oxide, zirconium dioxide, and alumina as opacifier and color modifiers (Nogueira & Della Bona, 2013). In addition, an opacifier substance may increase the radiopacity of direct restorative materials (Heffernan et al., 2002).

The e.max® ceramic is less opaque than d.SIGN® and this was verified by the present study. According to the manufacturer, e.max has a medium opacity and is composed by high

level of silica (SiO_2). Silica is important to form the vitreous phase of some ceramics and auxiliaries on the light transmittance of the light (Award et al., 2015).

As the e.max® ceramic is widely used in indirect restorations and showed values of transmittance significantly higher than d.SIGN®, we decided to verify if these ceramics with different transmittance would affect the degree of conversion of dual resin cements. The degree of conversion of a resinous material is of great importance for the clinical behavior of an indirect restoration.

The FTIR analysis detected significant differences in the degree of conversion of the different resin cement tested at different times when photopolymerized through d.SIGN® and e.max ceramics. The MultiLink Speed cement was less sensitive to light transmittance for polymerization in the initial minutes than the seT PP and RelyX™ U200 cement. These data suggest that a low light intensity is sufficient to initiate the chemical reaction of MultiLink Speed and that it continues to propagate over the subsequent 10 minutes. This means that any occlusal adjustments on the surface of the prosthetic restoration can be made safely few minutes after polymerization through an opaque ceramic.

Set PP and U200 exhibited the lowest values of the degree of conversion of monomers after 5 minutes of setting (without light), but after photopolymerization through e.max®, the degree of conversion increased considerably for both of them. These data suggest that seT PP and RelyX™ U200 are dependent to the light intensity at the beginning of their set. Although the initial polymerization of seT PP seems to be quite dependent on the light intensity, after 24 hours the d.SIGN® group exhibited a significantly higher degree of conversion than e.max®. A possible explanation for this finding is that the large conversion of monomers (42.7%) occurred in the first 10 minutes (through e.max®) formed a more compact three-dimensional polymer network. This may have impeded the transit of unconverted monomers

and their interaction with the molecules that form the chemical activation assembly (benzoyl peroxide and tertiary amines), reducing conversion kinetics through the 24 hours period.

It is also possible that the polymerization mechanisms induced by the chemical initiators act more slowly because our data showed that the degree of conversion of photopolymerized seT PP through d.SIGN® increased discreetly, although statistically significant, between 5 and 10 minutes. The low transmittance of light through d.SIGN® did not prevent seT PP from presenting a good conversion value of the resinous monomers after 24 hours, because it is possible that its chemical activation components had time and internal physical space so that the chemical union between monomers occurred over 24 hours. This more effective action in polymerization is therefore circumstantial and represents a compensation in the case of attenuation of light.

Conversion analysis of monomers also showed that RelyX™ U200 cement exhibits high dependence on light intensity for polymerization in the first minutes. Low conversion values were verified after 5 and 10 minutes both in the absence of light and in the photopolymerized discs through d.SIGN® ceramics, which exhibited the lowest transmittance between the ceramics. Moreover, when photopolymerized through the more translucent e.max ceramic, the conversion degree values were much higher after 5 and 10 minutes, remaining higher in relation to the d.SIGN® group even after 24 hours. Based on these results, we can infer that the self-polymerization condition does not allow the RelyX™ U200 to reach values comparable to the experimental conditions that use the photoactivation in the first minutes, as well as in the seT PP cement. One of the components of RelyX™ U200 cement is TEGDMA, a monomer diluent and useful for the formation of crosslinks between polymer chains. It has already been observed that the 1:1 molar ratio of BISGMA and TEGDMA produces polymers with good values of mechanical properties and low water absorption value (Gonçalves et al., 2015). TEGDMA is present in up to 10% by weight in U200. If few polymers are formed and

if there is a greater space between them, there is no way for TEGDMA to form the union between the polymer chains. Thus it is likely that when less light passed through the more opaque ceramic, a smaller number of polymers were formed, leading to less cross-linking function by TEGDMA.

Several studies have reported that most of the dual polymerization cements are extremely light-dependent and chemical polymerization alone is not capable of promoting adequate polymerization of these materials (Papazoglou et al., 2006; Arrais et al., 2008 et al., 2008).

In the present study, RelyXTM U200 cement presented very low values of monomer conversion in the first ten minutes, reinforcing the great dependence of the light intensity of this cement for adequate polymerization. Studies have shown that the self-polymerizable components of the cement are not able to compensate for the light attenuation through a 2 mm thick ceramic or resin restoration (El-Mowafy & Rubo, 2000). Flury et al. (2014) showed that different resin cement had a significantly lower degree of conversion when only chemical polymerization was carried out in comparison to photopolymerization. This strong dependence on light can lead to unfolding in some clinical situations, where very opaque ceramic restorations, such as ceramic copings (Ayres et al., 2015), or very thick may require an extra amount of energy to compensate for the passage of light deficient when using RelyXTM U200 cement.

Regarding RelyXTM Ultimate, despite no significant difference was observed in the degree of conversion between the photopolymerized groups through the d.SIGN® and e.max® after 5 minutes, the kinetics and conversion degrees were significantly higher in the e.max® group on 10 minutes and 24 hours. In the initial 5 minutes, RelyXTM Ultimate features a conversion of monomers close to MultiLink Speed values. Over time, this cement is dependent on light exposure. It is possible that the amount of initiators in the photo-

activatable component makes this material light-sensitive. It is likely that the polymer network has already reached a high degree of density at 10 minutes, which prevents the movement of monomers and the formation of new chemical bonds. This is visualized in the e.max® group by the discrete increase from 43.79% (10 minutes) to 49.29% after 24 hours. For the d.SIGN® ceramic, it is possible that the lower transmittance of light leads to the formation of a not so dense polymerized network, increasing the degree of conversion from 32.26% to 42.21% from the period of 10 minutes to 24 hours.

In the present study, although the degree of monomer conversion increased after 24 hours for all types of cement, regardless of the experimental condition (absence of light, direct exposure to light or through a ceramic barrier), the highest values were found when the cement was exposed directly to the light. This result is in agreement with previous studies that verified the same consequence to the degree of conversion of the cement (Di Francescantonio et al., 2013, Aguiar et al., 2015). During cementation of ceramic prostheses, although most of the resin cement is subject to interference from light transmission through the ceramic, the cementation line often receives direct light, which can increase the degree of conversion of monomers. This may be crucial because if the cement is not adequately polymerized in this region, there may be greater moisture absorption, a color change of the material and greater dilution of monomers, leaving the inner structure more porous and more susceptible to water absorption and hydrolytic degradation (Ferracane, 1985).

It is observed that the kinetics of polymerization becomes slower and dependent on the material factor in the presence of a light attenuator, especially for RelyX™ U200 and seT PP, which possess the dual mechanism of polymerization associated with an acid-base reaction between the acid monomers and the fluorine-aluminum-silicate particles (Gerth et al., 2006). When the base paste and the catalyst are mixed and then photoactivated, the immediate photoactivation guarantees an initial stability necessary to withstand the occlusal load,

whereas the chemical polymerization guarantees to optimize the physical and mechanical properties where the light is not able to reach (Arrais et al., 2008). One of the possible causes for a poorer degree of conversion of self-polymerizable cement may be the inability of free radicals and reactive monomers to move because of their change in viscosity during setting (Komori et al., 2010). This reasoning can be used as justification for the behavior of seT PP and RelyXTM U200, due to the acid-base reaction that occurs at the same moment as the polymerization of the monomers, generating an even higher viscosity and leading to reducing the chances of more monomers becoming polymers. The conventional resin cements RelyXTM Ultimate and MultLink Speed show a rise in the values of conversion degree over the most dizzying time due to a greater availability of free monomers that participate in the polymerization reaction over the course of 24 hours.

Appropriate monomer conversion are associated with longer clinical longevity (Kumbuloglu et al., 2004). The higher the conversion of monomers into polymers, the greater is the value of its modulus of elasticity and the greater the mechanical load to provide some deformation, fracture, and rupture of the union with the inner surface of the indirect restoration (Ilie & Hickel, 2008). Yet, there is no way to say which of the study materials would behave better clinically. Other factors besides the degree of conversion, such as the amount of inorganic filler, how hydrophilic are the monomers/polymers, diffusion coefficient and the solubility parameter of Hoy, determine the performance of the material when subjected to chewing, temperature changes and constant contact with moisture. The correct one, therefore, would be to say that when reaching a high conversion degree, the cement carries an extra advantage to contribute with the increase of its clinical longevity.

CONCLUSION

This study demonstrated that the effect of light attenuation through ceramics on monomer conversion varies between different dual resin cements, which may interfere with their physico-chemical properties, especially in the first minutes after cementation of restorations. Thus, mechanical studies will be useful to verify the effects of mechanical loading or immediate occlusal adjustment on restorations with opaque ceramics cemented with setPP or RelyXTM U200.

REFERENCES

1. Acquaviva PA, Cerutti F, Adami G, Gagliani M, Ferrari M, Gherlone E, et al. Degree of conversion of three composite materials employed in the adhesive cementation of indirect restorations: a micro-Raman analysis. *J Dent*. 2009 Aug;37(8):610-5.
2. Aguiar TR, de Oliveira M, Arrais CA, Ambrosano GM, Rueggeberg F, Giannini M. The effect of photopolymerization on the degree of conversion, polymerization kinetic, biaxial flexure strength, and modulus of self-adhesive resin cements. *J Prosthet Dent*. 2015 Feb;113(2):128-34.
3. Anusavice K. *Philips' science of dental materials*. 11th ed. St. Louise: Saunders, 2003. 832p.
4. Arrais CA, Rueggeberg FA, Waller JL, de Goes MF, Giannini M. Effect of curing mode on the polymerization characteristics of dual-cured resin cement systems. *J Dent*. 2008 Jun;36(6):418-26.
5. Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of composition on rate of polymerization contraction of light-curing resin composites. *Acta Odontol Scand*. 2002 Jun;60(3):146-50.
6. Awad D, Stawarczyk B, Liebermann A, Ilie N. Translucency of esthetic dental restorative CAD / CAM materials and composite resins with respect to thickness and surface roughness. *J Prosthet Dent*. 2015 Jun;113(6):534-40.
7. Ayres AP, Andre CB, Pacheco RR, Carvalho AO, Bacelar-Sá RC, Rueggeberg FA, Giannini M. Indirect restoration thickness and time after light-activation effects on degree of conversion of resin cement. *Braz Dent J*. 2015 Jul-Aug;26(4):363-7.
8. Bagis YH, Rueggeberg FA. The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. *Dent Mater*. 2000 Jul;16(4):244-7.

9. Braga RR, Cesar PF, Gonzaga CC. Mechanical properties of resin cements with different activation modes. *J Oral Rehabil.* 2002 Mar;29(3):257-62.
10. Brodbelt RH, O'Brien WJ, Fan PL. Translucency of dental porcelains. *J Dent Res.* 1980 Jan;59(1):70-5.
11. D'Arcangelo C, Zarow M, De Angelis F, Vadini M, Paolantonio M, Giannoni M, et al. Five-year retrospective clinical study of indirect composite restorations luted with a light-cured composite in posterior teeth. *Clin Oral Investig.* 2014;18(2):615-24.
12. Della Bona A, Anusavice KJ. Microstructure, composition, and etching topography of dental ceramics. *Int J Prosthodont.* 2002 Mar-Apr;15(2):159-67.
13. Dias MC, Piva E, de Moraes RR, Ambrosano GM, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L. UV-Vis spectrophotometric analysis and light irradiance through hot-pressed and hot-pressed-veneered glass ceramics. *Braz Dent J.* 2008;19(3):197-203.
14. Di Francescantonio M, Aguiar TR, Arrais CA, Cavalcanti AN, Davanzo CU, Giannini M. Influence of viscosity and curing mode on degree of conversion of dual-cured resin cements. *Eur J Dent.* 2013 Jan;7(1):81-5.
15. El-Mowafy OM, Rubo MH. Influence of composite inlay/onlay thickness on hardening of dual-cured resin cements. *J Can Dent Assoc.* 2000 Mar;66(3):147.
16. Ferracane JL. Correlation between hardness and degree of conversion during the setting reaction of unfilled dental restorative resins. *Dent Mater.* 1985 Feb;1(1):11-4.
17. Flinn BD, de Groot DA, Mancl LA, Raigrodsky AJ. Accelerated aging characteristics of three yttria stabilized tetragonal zirconia polycrystalline dental materials. *J Prosthet Dent* 2012;23:937-45.
18. Flury S, Lussi A, Hickel R, Ilie N. Light curing through glass ceramics: effect of curing mode on micromechanical properties of dual-curing resin cements. *Clin Oral Investig.* 2014 Apr;18(3):809-18.

19. Gerth HU, Dammaschke T, Züchner H, Schäfer E. Chemical analysis and bonding reaction of RelyX Unicem and Bifix composites--a comparative study. *Dent Mater*. 2006 Oct;22(10):934-41.
20. Giannini M, Di Francescantonio M, Pacheco RR, Cidreira Boaro LC, Braga RR. Characterization of water sorption, solubility and roughness of silorane and methacrylate-based composite resins. *Oper Dent*. 2014 May-Jun;39(3):264-72.
21. Gonçalves F, Boaro LC, Miyazaki CL, Kawano Y, Braga RR. Influence of polymeric matrix on the physical and chemical properties of experimental composites. *Braz Oral Res* (online). 2015;29(1):1-7.
22. Harada K, Raigrodski AJ, Chung KH, Flinn BD, Dogan S, Mancl LA. A comparative evaluation of the translucency of zirconias and lithium disilicate for monolithic restorations. *J Prosthet Dent*. 2016 Aug;116(2):257-63.
23. Hasegawa EA, Boyer DB, Chan DC. Hardening of dual-cured cements under composite resin inlays. *J Prosthet Dent*. 1991 Aug;66(2):187-92.
24. Heffernan MJ, Aquilino SA, Diaz-Arnold AM, Haselton DR, Stanford CM, Vargas MA. Relative translucency of six all-ceramic systems. Part II: core and veneer materials. *J Prosthet Dent*. 2002 Jul;88(1):10-5.
25. Ilie N, Hickel R. Correlation between ceramics translucency and polymerization efficiency through ceramics. *Dent Mater*. 2008 Jul;24(7):908-14.
26. Komori PC, de Paula AB, Martin AA, Tango RN, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L. Effect of light energy density on conversion degree and hardness of dual-cured resin cement. *Oper Dent*. 2010 Jan-Feb;35(1):120-4.
27. Kumbuloglu O, Lassila LV, User A, Vallittu PK. A study of the physical and chemical properties of four resin composite luting cements. *Int J Prosthodont*. 2004 May-Jun;17(3):357-63.

28. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater*. 2006 Oct;22(10):973-80.
29. Meng X, Yoshida K, Atsuta M. Influence of ceramic thickness on mechanical properties and polymer structure of dual-cured resin luting agents. *Dent Mater*. 2008 May;24(5):594-9.
30. Moraes RR, Faria-e-Silva AL, Ogliari FA, Correr-Sobrinho L, Demarco FF, Piva E. Impact of immediate and delayed light activation on self-polymerization of dual-cured dental resin luting agents. *Acta Biomater*. 2009 Jul;5(6):2095-100.
31. Nogueira AD, Della Bona A. The effect of a coupling medium on color and translucency of CAD-CAM ceramics. *J Dent*. 2013 Aug;41 Suppl 3:e18-23.
32. Papazoglou E, Rahiotis C, Kakaboura A, Loukidis M. Curing efficiency of a photo-and dual-cured resin cement polymerized through 2 ceramics and a resin composite. *Int J Prosthodont*. 2006 Jan-Feb;19(1):34-6.
33. Park SH. Comparison of degree of conversion for light-cured and additionally heat-cured composites. *J Prosthet Dent*. 1996 Dec;76(6):613-8.
34. Pianelli C, Devaux J, Bebelman S, Leloup G. The micro-Raman spectroscopy, a useful tool to determine the degree of conversion of light-activated composite resins. *J Biomed Mater Res*. 1999;48(5):675-81.
35. Pisani-Proenca J, Erhardt MC, Valandro LF, Gutierrez-Aceves G, Bolanos-Carmona MV, Del Castillo-Salmeron R, et al. Influence of ceramic surface conditioning and resin cements on microtensile bond strength to a glass ceramic. *J Prosthet Dent*. 2006 Dec;96(6):412-7.
36. Rueggeberg FA, Caughman WF, Chan DCN. Novel approach to measure composite conversion kinetics during exposure with stepped or continuous light-curing. *J Esthet Dent*. 1999;11(4):197-205.

37. Rueggeberg FA, Caughman WF, Curtis JW Jr. Effect of light intensity and exposure duration on cure of resin composite. *Oper Dent*. 1994 Jan-Feb;19(1):26-32.
38. Rueggeberg FA, Craig RG. Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. *J Dent Res*. 1988 Jun;67(6):932-7.
39. Ruyter IE, Nilner K, Moller B. Color stability of dental composite resin materials for crown and bridge veneers. *Dent Mater*. 1987 Oct;3(5):246-51.
40. Silva EM, Noronha-Filho JD, Amaral CM, Poskus LT, Guimarães JG. Long-term degradation of resin-based cements in substances. *J Appl Oral Sci*. 2013;21(3):271-7.
41. Uctasli S, Hasanreisoglu U, Wilson HJ. The attenuation of radiation by porcelain and its effect on polymerization of resin cements. *J Oral Rehabil*. 1994 Sep;21(5):565-75.
42. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Davidson CL, De Gee AJ, Lambrechts P, Braem M, et al. Dual cure luting composites – Part II: Clinically related properties. *J Oral Rehabil*. 1994 Jan;21(1):57-66.
43. Watts DC, Cash AJ. Analysis of optical transmission by 400-500 nm visible light into aesthetic dental biomaterials. *J Dent*. 1994 Apr;22(2):112-7.

TABLES

Table 1. Comparison of degree of monomer conversion of polymer MultLink Speed cement with or without light through IPS d.SIGN® or IPS e.max® ceramics at different times.

	Without light	With light (d.SIGN®)	With light (e.max®)
5 min	18.24 ± 0,006 ^{A,a}	29.46 ± 0,57 ^{B,a}	32.05 ± 0,21 ^{C,a}
10 min	22.23 ± 0,006 ^{A,b}	36.57 ± 0,71 ^{B,b}	35.52 ± 0.42 ^{C,b}
24 h	24.19 ± 0.23 ^{A,c}	47.37 ± 0,89 ^{B,c}	51.46 ± 0.46 ^{C,c}

Values expressed as percentage of monomer conversion ± standard deviation.

A, B, C Different capital letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different polymerization conditions (with or without light) at the same time. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by Sidak's post hoc test.

a, b, c Different lowercase letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different evaluated times (5 min, 10 min and 24 h) for each polymerization condition. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by the Tukey post hoc test.

Table 2. Comparison of the degree of conversion of the monomers of the polymerized seT PP cement with or without light, through the IPS d.SIGN® or IPS e.max® ceramics, at different times.

	Without light	With light (d.SIGN®)	With light (e.max®)
5 min	10.17 ± 0.004 ^{A,a}	24.17 ± 0.89 ^{B,a}	30.41 ± 0.005 ^{C,a}
10 min	25.09 ± 0.01 ^{A,b}	25.23 ± 0.66 ^{A,b}	42.7 ± 0.008 ^{B,b}
24 h	29.09 ± 0.01 ^{A,c}	49.73 ± 0.58 ^{B,c}	46.64 ± 0.008 ^{C,c}

Values expressed as percentage of monomer conversion ± standard deviation.

A, B, C Different capital letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different polymerization conditions (with or without light) at the same time. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by Sidak's post hoc test.

a, b, c Different lowercase letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different evaluated times (5 min, 10 min and 24 h) for each polymerization condition. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by the Tukey post hoc test.

Table 3. Comparison of the degree of monomer conversion of RelyX™ U200 polymer with or without light, through IPS d.SIGN® or IPS e.max® ceramics, at different times.

	Without light	With light (d.SIGN®)	With light (e.max®)
5 min	12.53 ± 0.01 ^{A,a}	23.23 ± 0.64 ^{B,a}	40.42 ± 0.04 ^{C,a}
10 min	15.08 ± 0.02 ^{A,b}	27.85 ± 0.90 ^{B,b}	41.89 ± 0.06 ^{C,b}
24 h	26.08 ± 0.02 ^{A,c}	42.70 ± 0.47 ^{B,c}	48.74 ± 0.05 ^{C,c}

Values expressed as percentage of monomer conversion ± standard deviation.

A, B, C Different capital letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different polymerization conditions (with or without light) at the same time. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by Sidak's post hoc test.

a, b, c Different lowercase letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different evaluated times (5 min, 10 min and 24 h) for each polymerization condition. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by the Tukey post hoc test.

Table 4. Comparison of the degree of conversion of monomers of RelyX™ Ultimate polymer with or without light, through IPS d.SIGN® or IPS e.max® ceramics, at different times.

	Without light	With light (d.SIGN®)	With light (e.max®)
5 min	18.16 ± 0.17 ^{A,a}	30.04 ± 0.45 ^{B,a}	31.41 ± 2.96 ^{B,a}
10 min	22.24 ± 0.44 ^{A,b}	32.26 ± 0.27 ^{B,b}	43.79 ± 3.4 ^{C,b}
24 h	25.47 ± 1.36 ^{A,c}	42.21 ± 0.69 ^{B,c}	49.29 ± 0.13 ^{C,c}

Values expressed as percentage of monomer conversion ± standard deviation.

A, B, C Different capital letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different polymerization conditions (with or without light) at the same time. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by Sidak's post hoc test.

a, b, c Different lowercase letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between different evaluated times (5 min, 10 min and 24 h) for each polymerization condition. p value obtained by the two-way ANOVA test with repeated measures, followed by the Tukey post hoc test.

Table 5. Degree of conversion of monomers of polymerized cements with direct light, without ceramic interference, at different times.

	MultLink Speed	seT PP	RelyX U200	RelyX Ultimate
5 min	38.75	39.91	47.82	43.85
10 min	41.51	49.73	61.32	47.39
24 h	55.31	57.90	69.13	57.46

Values expressed as a percentage of monomer conversion

FIGURES

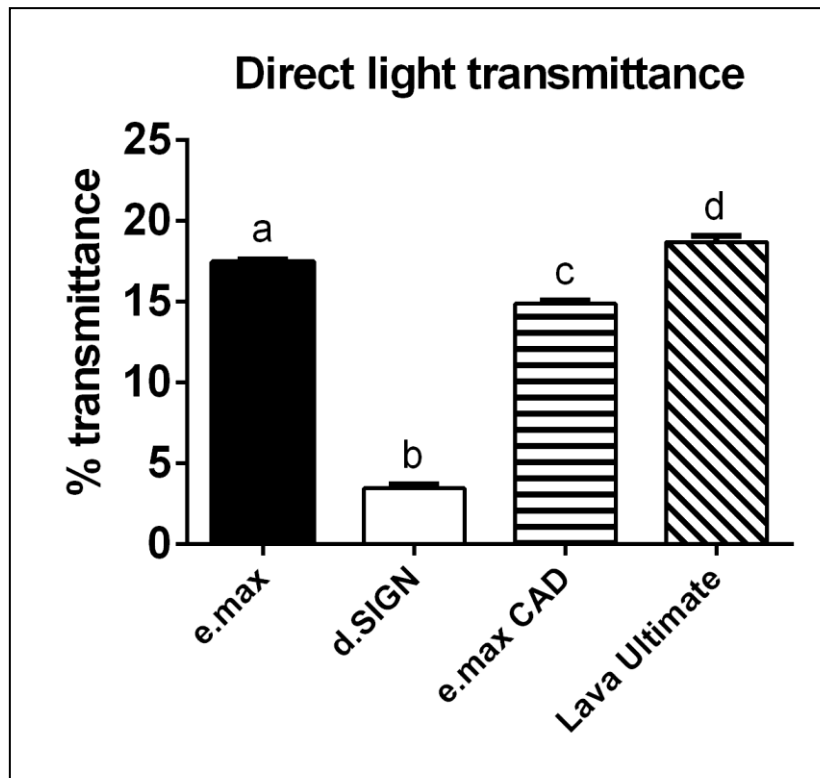


Figure 1. Percentage of light transmitted through ceramics.

Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups. p value obtained by the one-way ANOVA test without repeated measures, followed by the Tukey test. Error bars indicate standard deviation.

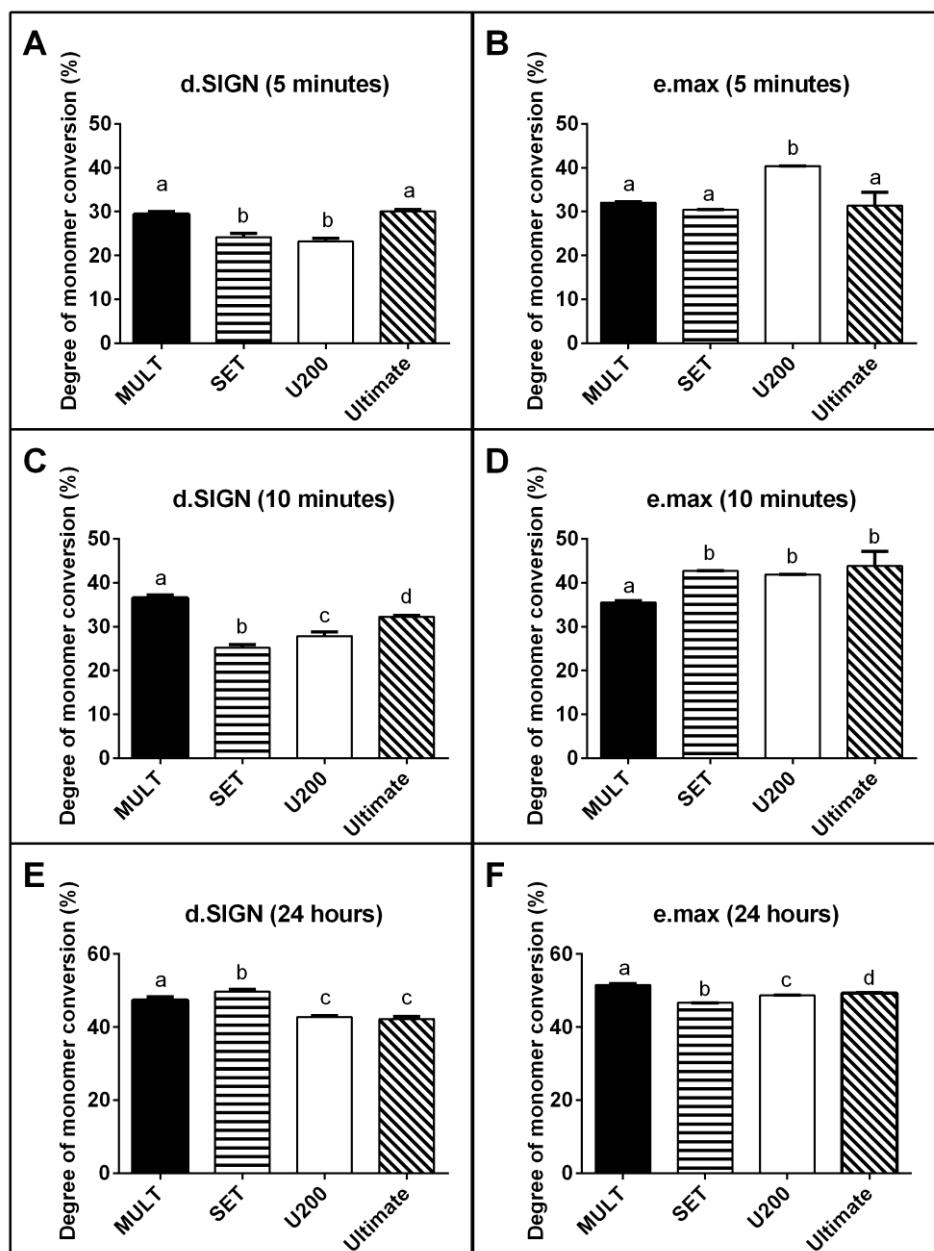


Figure 2. Comparison of the degree of conversion of monomers obtained by the FTIR method between the resin cements photopolymerized through the IPS d.SIGN® or IPS e.max® ceramics at different times. A) d.SIGN®, 5 minutes; B) e.max®, 5 minutes; C) d.SIGN®, 10 minutes; D) e.max®, 10 minutes; E) d.SIGN®, 24 hours; F) e.max®, 24 hours.

Different lowercase letters represent significant differences ($p < 0.05$) between photopolymerized resin cements through the IPS d.SIGN® or IPS e.max® ceramics. p value obtained by the one-way ANOVA test without repeated measures, followed by the Tukey test.

Error bars indicate standard deviation. MULT (MultLink Speed); SET (seT PP); U200 (RelyX™ U200); Ultimate (RelyX™ Ultimate).

7 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Nesta parte do trabalho foram avaliados os efeitos biológicos das substâncias liberadas pelos cimentos resinosos após polimerização, conforme utilização clínica. Como nossos resultados da primeira parte do trabalho mostraram que todas as cerâmicas avaliadas são bastante opacas, optamos por utilizar apenas a cerâmica IPS e.max[®] (Ivoclar Vivadente), que é amplamente utilizada na Odontologia, para fotopolimerização de 3 cimentos resinosos auto-condicionantes de polimerização dupla: MultiLink Speed (Ivoclar Vivadent[®]), seT PP (SDI) e RelyX[™] U200 (3M/ESPE[®]). Estes cimentos são utilizados clinicamente para adesão de restaurações cerâmicas, sendo colocados diretamente sobre o complexo dentina-polpa. A estratégia metodológica utilizada foi mergulhar os discos de cimento polimerizados em meio de cultura e utilizar o sobrenadante nas culturas de curta duração de células mononucleares de sangue periférico (CMSP). Com o objetivo de mimetizar em parte as condições inflamatórias da polpa, parte das CMSP foram estimuladas previamente com *S. mutans* e, em seguida, cultivadas com sobrenadante dos cimentos. Ao final das incubações, as células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT e pela marcação de 7AAD e Anexina. Por meio de reações de imunofluorescência e citometria de fluxo, foram quantificadas células produtoras das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α . Os resultados desta parte da tese foram compilados na forma de artigo científico intitulado: **“Products released from dual resin cements differentially affect cytokine production by human monocytes stimulated with *Streptococcus mutans*”**, que será submetido ao periódico **Dental Materials (Qualis A1 Odontologia)**.

Normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico: <https://www.elsevier.com/journals/dental-materials/0109-5641/guide-for-authors>.

Products released from dual resin cements differentially affect cytokine production by human monocytes stimulated with *Streptococcus mutans*

Guilherme Senna Figueiredo Azevedo^a, Luísa Mourão Dias Magalhães^b, Walderez Ornelas Dutra^{b,c}, Kenneth John Gollob^{c,d}, Natália Rocha Guimarães^e, Paula Prazeres Magalhães^e, Luiz de Macêdo Farias^e, Martinho Campolina Rebello Horta^a, Paulo Eduardo Alencar de Souza^a.

^a Graduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Morphology, ICB, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^c National Institute of Science and Technology in Tropical Diseases - INCT-DT, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^d Post-graduation Program in Medicine and Biomedicine, Institute of Education and Research, Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Center for Teaching and Research, Instituto Mário Penna, Belo Horizonte, Brazil.

^e Department of Microbiology, ICB, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Correspondence to author: Paulo Eduardo Alencar Souza. Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais. Avenida Dom José Gaspar, 500, Building 46, Room 101, Eucharistic Heart. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 30535-901. Phone: +55 31 3319-4414. FAX: +55 31 3319-4415. E-mail: pauloalencar@pucminas.br.

SUMMARY

Objectives: The objective of this study was to evaluate the biological effects of substances released by resin cements after photopolymerization through ceramics in the production of cytokines by human monocytes stimulated with *Streptococcus mutans*.

Methods: MultiLink Speed (Ivoclar Vivadent®) (MULT), seT PP (SDI) (SET) and RelyX™ U200 (3M/ESPE®) (U200) resin cements were photopolymerized using lithium disilicate ceramic and dipped in RPMI medium for 24 hours. Supernatants were added to human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), stimulated or not with *S. mutans*. Cell viability was assessed by MTT assay. Cell death and expression of the cytokines IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α in monocytes were determined using cytometry flow.

Results: U200 supernatant generated lower cell viability between PBMC regardless of the stimulation with *S. mutans*. Concerning apoptosis, there were no significant differences between the groups evaluated. As for the monocyte population, the cements did not cause significant changes in cell viability. However, addition of the supernatants from the three cements to the cells stimulated with *S. mutans* reduced the production of the cytokines. Percentages of monocytes producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α were lower in the U200 group than in the MULT group. Percentages of monocytes producing IL-6, IL-8 and TNF- α were also lower in the SET group when compared to MULT.

Significance: Our results show that products released from resin cements affect the production of cytokines by immunocompetent cells stimulated by cariogenic bacteria, and may interfere with the immunoinflammatory mechanisms involved in the control of microorganisms and the protection of pulp tissue.

Keywords: Resin cements. Polymerization. Leukocytes. *Streptococcus mutans*. Cytokines. Cytotoxicity.

1. Introduction

Resinous materials for dental use such as composite resins and resin cements have a polymer chain which are susceptible to hydrolytic and hygroscopic effects at varying levels, depending on their composition and structure. In addition, these resinous materials can release unreacted components in the polymerization process (Gerzina & Hume, 1996; Geurtsen, 2000; Ferracane, 2006). The biological compatibility of resinous materials is predominantly determined by the amount and nature of the organic components and their effects arise from the action of substances released into the oral cavity or dental pulp (Bouillaguet, 2004; Emmeler et al., 2008; Urcan et al., 2010).

The release of residual monomers from the composite resins is influenced by several factors including the solubility and molecular weight of the monomers used, the degree of conversion, the degree of crosslinking of the polymer chain, the surface treatment of the charge particles and the nature of the solvent (Santerre et al., 2001; Sideridou & Achilias, 2005; Ferracane, 2006). The polymerization process of methacrylate monomers by free radicals produces extensive chains of crosslinking polymers, but also leaves unreacted monomers (Rueggeberg et al., 1999). Studies have shown that about 10% or less of the groups of unreacted methacrylate monomers are as residual monomers and are available to release into various soluble media (Ferracane, 1994). Elution tests showed that 0.05% to 2% of the weight of the resins is reduced in aqueous medium and 2 to 6% in alcohol or other organic solvents (Ferraz et al., 2000).

Specifically for cytotoxicity, monomers are known to cause diverse biological effects on cells, such as cell membrane damage, inhibition of the activity of cellular metabolism enzymes, cell cycle delay and disruption, genetic mutation, chain

breakage of DNA and apoptosis by reduction of GSH (glutathione) via oxidative stress (Schweikl et al., 2005). Cell culture studies have shown that dimethacrylate monomers (Bis-GMA and TEGDMA) can cause, in subtoxic concentrations, an increase in leukocyte recruitment to sites of inflammation and induce cytokine expression in vitro (Gregson et al., 2008).

Other studies have shown that resinous monomers, by suppressing the activity of mitochondria in cells, alter the inflammatory response capacity of macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide (LPS), inhibiting the secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) (Rakich et al., 1998; Rakich et al., 1999).

Thus, products released from resin dental materials have the potential to affect immunoinflammatory responses, which may alter important mechanisms to combat microorganisms and maintain the integrity of oral tissues (Lee et al., 2006; Arossi, 2013).

The dental pulp contains immunocompetent cells that respond to microbial and chemical aggressor stimuli, generating tissue changes that characterize pulp lesions (Jontell et al., 1998). Many studies state that pulp inflammation may be caused by failure of adhesive system adhesion to the dentin surface, which would cause a micro-bacterial infiltration in this area. Bacteria, such as *Streptococcus mutans*, can cause inflammation in the pulp tissue due to the induction of the production of IL-1, IL-6, IL-12 and TNF- α by macrophages, leading to inflammatory cell migration and stimulation of the phagocytic activity (Cox et al., 1996; Bergenholz, 2000; Lygre et al., 2001). Studies have shown the expression of IFN- γ , IL-4, IL-1 α , IL-1 β , IL-1 β , CCL2, TNF and IL-10 cytokines in inflamed pulpal tissue due to exposure of pulp cells to different bacterial agents (Hahn et al., 2002). The cytokines are

responsible for mediating the intensity of the immunoinflammatory responses, controlling mechanisms to combat microorganisms and tissue destruction (Petkovic et al., 2010; Cekici et al., 2014).

The aim of this study was to determine and compare the cytotoxicity and effects of the substances released by three dual resin cements on the frequencies of monocytes producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α in peripheral blood mononuclear cells stimulated or not with *Streptococcus mutans*.

2. Materials e methods

2.1. Preparation of supernatants of resin cements

In this study, double polymerization resin cements were used: MultiLink Speed (Ivoclar®) (MULT), seT PP (SDI) (SET) and RelyX™ U200 (3M/ESPE®) (U200). Cement discs of 11 mm diameter by 1 mm in height were made using sterile silicone mold adapted for overlapping ceramic discs. The cements were applied to the bottom of the silicon matrix and a 2 mm thick lithium di-silicate (e.max®, Ivoclar Vivadent) ceramic disc was placed on the matrix without touching the cement. The cements were polymerized in sterile environment by LED light (Radical, SDI, Australia) with intensity of 1350 mW/cm², for 40 seconds, with energy density of 54 Joules. After photopolymerization, the resin cement discs were placed in a 24-well flat bottom plate and immersed in 1.5 mL of RPMI medium containing 100 IU/mL of potassium penicillin G and 100 μ g/mL of streptomycin. After 24 hours incubation in a humid oven at 37°C, 5% CO₂, the supernatants containing substances released from the resin cements were collected and frozen at -80°C for use in the experiments.

2.2. Preparation of bacteria

Streptococcus mutans (ATCC 25175) was grown on Tryptic Soy Agar (TSA - Difco, Sparks, MD, USA) enriched with 5% sheep blood in microaerophylia at 37% for 48 hours. Then, the bacteria were collected into tubes containing Brucella Broth medium (BBL Sparks, MD, USA) plus 10% glycerol. The concentration of bacteria in suspension was determined in a spectrophotometer (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Biochrom, Cambridge, UK) at OD650 wavelength. Bacteria were maintained at -80°C. For use in the experiments, the bacteria were washed three times with sodium phosphate-saline (PBS) buffer (1500 X g, 10 minutes), inactivated by heating at 100°C for 10 minutes and resuspended in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI) (Sigma Aldrich).

2.3. Obtaining peripheral blood mononuclear cells

This study was approved by the Research Ethics Committee of PUC Minas (CAAE: 78981517.4.0000.5137) and conducted in accordance with current regulations. Ten milliliters of blood from ten healthy volunteer donors was collected from tubes containing heparin (Becton Dickinson Vacutainer®, USA). Exclusion criteria were: patients with systemic infectious disease, immunodeficient individuals and users of medication capable of interfering with the immunoinflammatory response, such as anti-inflammatories and immunosuppressive drugs. To obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC), the blood was diluted in 1:1 phosphate-saline buffer (PBS) and applied to 10 mL of Ficoll-Paque (Pharmacia). After centrifugation at 200 X g for 40 minutes at 20°C for density gradient formation, the PBMC were collected, washed three times with PBS (200 X g, 10 minutes, 4°C) and resuspended in complete medium (RPMI plus of 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml of

potassium penicillin G and 100 µg/ml of streptomycin and 5% of normal human serum).

2.4. MTT assay

To evaluate the cytotoxicity of the products released by the resin cements, 2×10^5 PBMC were transferred to each well of flat bottom 96 well plates and added MULT, SET or U200 supernatants at final dilutions of 1:3 or 1:4 in complete RPMI medium. After 20 hours in a humid atmosphere at 37°C, 5% CO₂, the cells were submitted to the functional evaluation colorimetric test to analyze the mitochondrial activity. As negative control cells were heated at 100°C for 15 minutes. The experiments were performed in triplicate. Methyl tetrazole (MTT, 2.5 mg/mL) was added in final concentration of 10% v / v, and the cells incubated for an additional 4 hours at 37°C, 5% CO₂. The formazan precipitates were dissolved with addition of 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) and, after homogenization, wavelength reading of 575 nm (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) was performed. Data were expressed as percentage of viable cells relative to the control (PBMC with RPMI only).

2.5. Stimulation of PBMC for evaluation of cell death and cytokines

To verify the effect of the substances released by resin cements on cell death and cytokine production by monocytes, 2.5×10^5 PBMC were added to each well of 96-well U-bottom pots and incubated for 1 hour at 37°C, 5% CO₂. Then, supernatants of the MULT, SET or U200 resin cements were added at the dilution of 1:4 and incubation was carried out for another 7 hours in a CO₂ oven. To verify the effect of substances released by the materials on cytokine production by PBMC

stimulated by cariogenic bacteria, the cells were preincubated with 1:1 *Streptococcus mutans* (Sm) for 1 hour at 37°C, 5% CO₂. Then, supernatant of the resin cements at the 1:4 dilution was added and incubation was carried out for another 7 hours. In the negative control group, PBMC received only complete RPMI medium (Control) and in the positive control group (Sm), the PBMC were incubated with *S. mutans* only. Four hours before the end of the incubation, Brefeldin A (1 µg/mL) (E Biociensce, San Diego, CA, USA) was added, which blocks the secretion of proteins, concentrating the cytokines in the Golgi complex of the cells.

In this way, eight experimental conditions were obtained for PBMC of each donor: Control (RPMI only), MULT, SET, U200, Sm (*S. mutans*), Sm-MULT, Sm-SET, Sm-U200.

2.6. Quantification of apoptotic cells

To verify the effect of the substances released by resin cements on cell death, 3x10⁵ PBMC from each experimental condition cited above were stained using Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (BioLegend, San Diego, CA, USA). PBMC were washed 2 times with Cell Staining Buffer by centrifugation (8 min., 200 X g, 4°C) and resuspended in 100 µl of Annexin V Binding Buffer. bv-421 anti-human CD14 antibody (BioLegend), APC conjugated Annexin V, and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) Viability Staining Solution were added and the cells were incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. The cells were then washed with PBS and analyzed by flow cytometry.

2.7. Immunofluorescence reactions for detection of cytokines

Immunofluorescence reactions were performed according to protocol described by de Souza et al. (2005). For phenotypic identification of monocytes, cells were centrifuged (8 minutes, 200 X g, 4°C) and incubated for 15 minutes at 4°C with anti-CD14 monoclonal antibody solution (clone M5E2, BioLegend) diluted in 0.015 M PBS, pH 7.4, with 0.01% azide and 0.2% bovine serum albumin (BSA). The cells were then washed with PBS and fixed with 2% formaldehyde solution in PBS for 20 minutes at room temperature. For intracytoplasmic cytokine labeling, cells were permeabilized with 0.5% saponin (SigmaAldrich) for 10 minutes and incubated with monoclonal antibodies anti-IL-1 α (clone 364-3B3-14, BioLegend), IL-6 (clone MQ2-13A5, BioLegend), IL-8 (clone BH0814, BioLegend), IL-10 (clone JES3-9D7, BioLegend), IL-12 (clone C115, BioLegend) and TNF- α (clone MAb11, BioLegend) for 30 minutes at room temperature. After two washes with saponin solution, the cells were resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry.

2.8. Cytometric analysis

The labeled cells were analyzed on a flow cytometer (FACSCanto™ II, Becton Dickinson, New Jersey, USA). Approximately 70,000 cells were evaluated for each experimental group. The cytometric data were analyzed using FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc., USA).

For cell death analysis, the total population of PBMC and the population of CD14⁺ monocytes were selected in the dot plot graph of cell size versus cell granularity (Fig. 1). 7AAD-Anexin⁺ cells were considered apoptotic cells; 7AAD⁺Annexin⁺ cells in late apoptosis or necrosis; and 7AAD⁻Annexin⁻ cells were

considered viable cells. The results were expressed as percentage of cells within the total PBMC population and within the CD14+ monocyte population.

For cytokine analyzes, the percentages of cells expressing each of the evaluated cytokines within the CD14+ monocyte population were determined (Fig. 2).

2.9. Statistical analyzes

The Kolmogorov-Smirnov normality test showed normal distribution of the data. To verify the existence of differences between the groups in both cell viability analysis and cytokine expression, the one-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test were employed, with significance level of 5%. Analyzes were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3. Resultados

3.1. Cytotoxicity of MTT resin cements

The MTT assay showed that only incubation with U200 supernatant at the 1:3 dilution was able to significantly reduce the viability of PBMC compared to the control (Fig. 3).

As in the 1:4 dilution of the supernatants no significant differences were observed in the percentage of viable cells compared to the control, this dilution was used for the cytokine production evaluation experiments.

3.2. Effect of resin cements on cell death by the Annexin/7AAD labeling method

To verify whether the reduction in cell viability observed after addition of the cements supernatants was due to apoptosis, PBMC previously stimulated or not with

S. mutans and incubated with the cements supernatant at a 1:4 dilution, for a total time of 8 hours, were stained with Annexin V and 7AAD. Only the U200 and Sm-U200 groups showed a significant reduction in cell viability compared to Control (Fig. 4A). Addition of U200 supernatant to PBMC significantly reduced cell viability when compared to MULT, in the presence or absence of prior stimulation with *S. mutans* (Fig. 4A). Moreover, addition of U200 to PBMC stimulated with *S. mutans* significantly reduced cell viability relative to the Sm group (Fig. 4A). The mean viability of PBMC between the groups ranged from 80.7 to 95.7%.

In relation to apoptosis, there were no significant differences in the percentage of apoptotic cells (7AAD⁻Annexin⁺) among the groups (Fig. 4C). Considering the cells in late apoptosis or necrosis (7AAD⁺Annexin⁺), the group stimulated with *S. mutans* and U200 (Sm-U200) presented higher frequencies of double-positive cells when compared to the Control, Sm, Sm-MULT or Sm-SET groups (Fig. 4E).

Analysis of the CD14⁺ monocytes showed no significant differences between the groups regarding cell viability (Fig. 4B), apoptosis (Fig. 4D) and late apoptosis or necrosis (Fig. 4F). The mean cell viability in the CD14⁺ monocyte population ranged from 81.8 to 90.4% between the groups.

3.3. Effect of resin cements on the production of cytokines by monocytes

Incubation of PBMC with supernatant from MULT, SET or U200 resin cements did not significantly affect the frequencies of monocytes producing the cytokines as compared to the Control group (Fig. 5). No differences were also observed between groups of resin cements.

The incubation of the PBMC with *S. mutans* for 8 hours caused a significant increase in the frequencies of CD14⁺ monocytes producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12

and TNF- α when compared to the Control group (Fig. 5). The frequencies of IL-10⁺ monocytes were low in all experimental groups. The addition of supernatant from the resin cements to PBMC stimulated with *S. mutans* significantly affected the production of the evaluated cytokines. In the *S. mutans*-stimulated groups, the addition of U200 reduced the frequencies of CD14⁺ monocytes producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α while the addition of SET reduced the frequencies of CD14⁺ monocytes producing IL-1 α , IL-6 and TNF- α (Fig. 5). MULTI supernatant only reduced the frequency of CD14⁺ monocytes producing TNF- α (Fig. 5).

Comparing the effect of different resin cements on *S. mutans*-stimulated CD14⁺ monocytes, the U200 group showed lower frequencies of IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α and IL-12 cytokines than the MULT group (Fig. 5). Under stimulation with *S. mutans*, the SET group also presented lower frequencies of IL-6, IL-8 and TNF- α positive monocytes when compared to the MULT group (Fig. 5). Still analyzing the cells stimulated with *S. mutans*, no significant differences were detected in the frequencies of CD14⁺ monocytes expressing the cytokines evaluated between the SET and U200 groups.

4. Discussion

The cytotoxicity of resinous monomers and products released from different resinous materials has already been demonstrated by different methods (Rakich et al., 1998; Gerzina & Hume, 1996; Bouillaguet, 2004; Schweizer et al., 2007).

In the present study the cytotoxicity of products released from dual resin cements in the first 24 hours after photopolymerization was evaluated in human PBMC and the results showed that only supernatant of U200 at higher concentrations was able to significantly reduce cell viability by the MTT method. It is interesting that U200 supernatant presented greater cytotoxicity than MULT and SET,

although it exhibited higher degrees of conversion of monomers by FTIR spectroscopy than the other cements as early as the first 5 minutes after photopolymerization under the same conditions of the present study (data not shown). This suggests that differences in the composition of monomers between the cements or that other substances, such as photoinitiators, activators and radiopacifiers, may be involved in toxicity to human immunocompetent cells.

It has been shown that different monomers reduce mitochondrial succinate dehydrogenase activity in human macrophages *in vitro* by the MTT assay, with UDMA being the most toxic, followed by Bis-GMA, 4-META and HEMA (Rakich et al., 1998). Polymerized resin cements were also able to reduce cell activity by the MTT assay in pulp cell cultures, in a dose dependent manner, with Panavia F exhibiting higher cytotoxicity than Super Bond C & B and Chemiace II (Kong et al., 2009).

Studies have shown that resinous dentin adhesives, such as Prime Bond and Scotchbond, were also able to reduce the viability of monocytes in culture to about 60% and that this reduction was greater after 36 hours than after 72 hours, indicating that greater release of toxic products, such as resinous monomers, occur in the first few hours (Vahid et al., 2004).

In the present study, the Annexin V and 7AAD labeling method showed that, even at lower concentrations, U200 supernatant reduced PBMC viability with or without previous stimulation with *S. mutans*. This effect was not observed when we analyzed the CD14⁺ monocyte population, suggesting that other leukocyte subpopulations, such as lymphocytes and natural killer cells, are more susceptible to the cytotoxic effects of U200 released products in the first hours after polymerization. Differences in susceptibility to the toxic effects of resin cements have already been

reported. Odontoblast cells are more sensitive to the toxic effects of resinous materials than pulp fibroblasts (Yasuda et al., 2008).

In PBMC under stimulation with *S. mutans*, addition of U200 supernatant generated percentages of cells in late apoptosis or necrosis (7-AAD⁺Annexin V⁺) significantly higher than the MULT and SET cements, confirming a higher cytotoxicity of this cement in cells exposed to cariogenic bacteria. Due to anatomical and physiological factors, pulp tissue has limited capacity to respond to bacterial invasion or other noxious stimuli (Jontell et al., 1998). Considering the frequent exposure of immunocompetent cells in the pulp to bacterial products in teeth restored with caries infiltration, the use of U200, mainly in deep cavities, could allow the diffusion of products through dentinal tubules capable of significantly affecting the activity of cells involved in the immunoinflammatory processes. In a recent study, it was demonstrated that the application of different self-etching adhesive materials on dentin discs *in vitro* resulted in significant diffusion of resinous monomers, mainly HEMA, which significantly reduced the viability of odontoblastic cells sown on the opposite surface of dentin discs (Lanza et al., 2009).

Several studies have shown the potential of resinous monomers, such as hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), to induce cellular apoptosis, even at low concentrations, by increasing the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and decreasing the activity of intracellular antioxidants (Lee et al., 2006; Chang et al., 2010, Arossi, 2013). In the present study, no significant effects were observed in the percentage of apoptosis cells (7AAD⁺Annexin V⁺) after incubation with supernatants of resin cements, both in the total PBMC population and in the CD14⁺ monocyte population, regardless of the *S. mutans* stimulation. Although our data did not show induction of apoptosis after 8

hours of incubation, it is possible that this effect is dependent on the longer exposure time and higher concentration of the products released from the cements. It has been demonstrated by *in vitro* assays that resinous monomers decrease the viability of immunocompetent cells in a dose-dependent manner (Jontell et al., 1998; Lee et al., 2006). In murine macrophages, the addition of HEMA considerably increased the number of apoptotic cells after 20 hours and this effect was dose-dependent (Becher et al., 2006). TEGMA and HEMA were also able to increase the number of apoptotic cells between hamster lung fibroblasts by about 20% (Lee et al., 2006). Although all these toxic effects are documented, their size and morbidity in the pulp tissue are not fully understood.

The complete chemical composition of the commercially available resinous materials is not always known. Cytotoxic potentials of resinous materials should be well studied as their use has increased in recent years and some cements may include active ingredients that may modify the metabolism of pulp cells when used in deep cavities or when they come into direct contact with pulp tissue (de Souza Costa et al., 2006).

In addition to the cytotoxic effects, it has already been demonstrated that resinous monomers are also capable of affecting the production of immunoinflammatory mediators by different cell types. Addition of resinous monomers to lipopolysaccharide (LPS)-stimulated innate immunity cells was able to reduce the action of MAP kinases and consequently the release of immune-inflammatory mediators, suggesting that monomers may interfere with the inflammatory response, inducing a more moderate immune response (Schmalz et al., 2011). Another study showed reduced secretion of TNF- α by LPS-stimulated monocytes after exposure to different concentrations of the resinous monomers

TEGDMA and HEMA (Noda et al., 2002). Secretion of TNF- α , IL-6 and IL-10 by LPS-stimulated macrophages was also reduced after addition of TEGDMA (Eckhardt et al., 2009). It has also been reported that HEMA and TEGDMA may interfere with the post-transcriptional regulation of the synthesis and release of IL-1 β and TNF- α , and that low monomer concentrations may influence the activation of macrophages (Bølling et al., 2013).

Considering that resin cements are applied directly to the dentin, the products released from these materials could affect the immunocompetent cells present in the pulp as monocytes/macrophages. In the present study, incubation of PBMC with MultiLink Speed, seT PP and RelyX U200 cements supernatants did not significantly affect the frequency of monocytes producing IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α and IL-10. Although several studies on the physicochemical characteristics of resin cements have been performed, there are no studies on their effects on the production of cytokines by human monocytes.

Teeth in need of indirect restorations frequently exhibit carious lesions, either by open cavity or by bacterial infiltration in existing restorations, and thus the pulpal tissue is already inflamed in response to cariogenic bacteria and their products. Cariogenic bacteria release molecules that induce cytokine secretion by immunocompetent cells (Hong et al., 2014). *S. mutans* is one of the main bacteria responsible for the onset of the carious lesion (Hahn et al., 2000). It has several surface molecules, such as lipoteichoic acid, that activate the immunoinflammatory response promoting the secretion of cytokines such as IL-1, IL-8, TNF- α and IL-12 by immunocompetent cells of the pulp, such as macrophages and dendritic cells (Engels-Deutsch et al., 2003; Hong et al., 2014).

Although the substances released from the resin cements evaluated in this study did not significantly affect resting human monocytes, it is possible that these cells when stimulated by cariogenic bacteria are susceptible to the effects of these substances on the production of cytokines. Considering the frequent stimulation of immunocompetent cells of the pulp by cariogenic bacteria and their products, in the present study, the PBMC were previously stimulated with *S. mutans* and then exposed to the supernatants of the cements. Cytometric analysis showed that stimulation with *S. mutans* significantly increased the frequencies of monocytes producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α . Several studies have shown the potential of *S. mutans* to stimulate the production of cytokines. Engel-Deutsch et al. (2003) found changes in TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-10 cytokine production by THP-1 lineage cells, periodontal ligament cells and dental pulp cells, when stimulated with *S. mutans* in different periods. *S. mutans* was also able to induce secretion of IL-10 and IL-12, but not IL-4, by PBMC in a manner dependent on bacterial concentration (Hahn et al., 2000).

The addition of supernatant from the cements was able to significantly reduce the frequencies of cytokine producing monocytes. The present study showed that the potential for inhibition of cytokine production varied according to each type of cement. The U200 was the cement with effect in a greater variety of cytokines and MULT had effect only in the production of TNF- α .

Proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α stimulate the expression of adhesion molecules by vascular endothelium and the activation and recruitment of neutrophils to the extravascular tissues, increasing tissue inflammatory infiltrate (Hysine et al., 2000). In addition, these cytokines stimulate the secretion of collagenase by fibroblasts and activate osteoclasts for bone resorption (Pezelj-

Ribaric et al., 2002; Hehlhans & Pfeffer, 2005; Hungness et al., 2000). In contrast, anti-inflammatory cytokines such as IL-10 inhibit the expression of pro-inflammatory cytokines by limiting the magnitude of the inflammatory response (Eckhardt et al., 2009). Thus, the balance between pro and anti-inflammatory cytokines may determine the course of tissue reactions. In the present study, the frequencies of IL-10 producing monocytes were very low in all experimental groups.

Reduction in the frequencies of monocytes producing the proinflammatory cytokines under stimulation with *S. mutans* suggests that these cements have an anti-inflammatory potential in relation to the immunocompetent cells of the pulp. This effect could contribute to the reduction of vasodilation, increased vascular permeability and inflammatory pulp infiltrate, resulting from bacterial stimulation (Gilman et al., 2006), contributing to the maintenance of the tissue integrity of the pulp and minimizing pain manifestations. In this sense, products released from U200 cement would present a higher anti-inflammatory potential for monocytic/macrophage cells in pulp tissues. Since dental pulp has a limited capacity of defense and repair because it is circumscribed by rigid dentin walls and has no collateral blood circulation, an anti-inflammatory effect of the cement could contribute to protect this tissue (Jontell et al., 1998). Studies have shown that proinflammatory cytokines such as IL-1 stimulate the secretion of collagenases by fibroblasts, leading to destruction of fibrous connective tissue (Izutani et al., 2011). On the other hand, the reduction in the production of pro-inflammatory cytokines could lead to less activation of immunocompetent cells, reducing the potential of fighting the cariogenic microorganisms and their products that reach the dental pulp. However, it is considered that, for adequate dental restoration, it is essential to remove carious dentin tissue, as well as to seal residual dentin infected by adhesive restorative

materials, preventing the access of nutrients to the residual cariogenic bacteria and thus reducing to insignificant levels the pulpal inflammatory response.

Although effects on cytokine production by monocytes were clearly demonstrated in the present study, the effects of cements on the activity of other cell components of the inflammatory pulp infiltrate, such as lymphocytes, Natural Killer cells and neutrophils, were not evaluated.

In the present study, the Sm-U200 group showed lower frequencies of monocytes producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α than the Sm-MULT group. No significant difference was observed between Sm-U200 and Sm-SET groups. As discussed previously, the inhibitory effects of U200 and SET on the expression of proinflammatory cytokines by *S. mutans* stimulated macrophages, although they may contribute to the reduction of pulpal inflammation, may inhibit the recruitment and stimulation of phagocytes, which act in the combat to cariogenic bacteria. In this sense, the use of U200 and SET could represent a risk, since regardless of the elimination of visible caries, the floor of the cavity may remain with some bacterial contamination of the carious process, thus requiring a normal functionality of PBMC to combat aggressive agent and avoid possible sepsis (Schmalz et al., 2011).

In the groups stimulated with *S. mutans* SET was also able to reduce the frequencies of proinflammatory cytokine-producing monocytes, with the exception of IL-8. This cytokine is produced by mononuclear phagocytes activated by microorganisms and has chemotactic function mainly for neutrophils, constituting an important mediator in the early stages of infection control (Bickel, 1993). Thus, it is possible that, although the products released from SET may reduce the inflammatory process, neutrophil recruitment may not be significantly affected, contributing to the fight against cariogenic bacteria.

Many studies on the cytotoxicity of resinous materials used in dentistry have evaluated the effect of resinous monomers on different cell types. Resin monomers, by suppressing the activity of mitochondria in cells, altered the inflammatory response capacity of macrophages stimulated with bacterial LPS, inhibiting the secretion of TNF- α and IL-1 (Rakich et al. al., 1999). However other components present in these materials with photoinitiators, activators and diluents are able to inhibit the proliferation of pulp cells and induce the release of large amount of IL-6 and IL-8, as demonstrated in a previous study (Kim et al., 2013). In view of this we can assume that the differences found in the results between the cements tested in this study may be related not only to the formation of the main resinous monomers but also as the other components present in the composition of these materials.

Although our data point to the anti-inflammatory effect of the products released from the cements in human monocytes stimulated with *S. mutans*, it is important to point out some limitations of the study. Several bacterial species are found in the carious lesions and participate in the immunoinflammatory stimulation of the dental pulp. In the present study, PBMC were stimulated by only one bacterial species, *S. mutans*, which was previously inactivated by heat. In the inflamed dental pulp, several leukocyte types participate in immunoinflammatory responses, and in the present study, although cytotoxicity was determined in PBMC, cytokine production was evaluated only in monocytic cells. The concentration of the products released from resin cements reaching the pulp can be influenced by several factors, such as the thickness of the dentin barrier and the degree of polymerization of the dual cement, the latter depending on the light intensity transmitted by the ceramic. In the present study only a sublethal concentration of products released from the cements was evaluated. Finally, the intensity of the immunoinflammatory response of the pulp

may vary, and thus the effects of the cements on the activity of immunocompetent cells may also be different. Further studies should be carried out using other bacterial species and different incubation times to better understand the effects of these resin materials on the activity of human immunocompetent cells. Therefore, more studies are needed to establish the possible risks of these effects *in vivo*, especially in the pulp and gingival tissues, where chronic exposures to components of dental material are greater.

In conclusion, the results obtained in this study suggest that products released in the first hours after polymerization of RelyXTM U200 and seT PP resin cements significantly affect the production of cytokines by immunocompetent cells stimulated by cariogenic bacteria, and may interfere in the immunoinflammatory mechanisms involved in the fight against microorganisms and in the protection of pulp tissue.

References

- [1] Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia básica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.
- [2] Arossi GA. Implicações biológicas de monômeros de odontológico. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2013 Jan-mar;11(35):45-55.
- [3] Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA e HEMA and two compomers extracts. *Dent Mater*. 2006 Jul;22(7):630-40.
- [4] Bergenholz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(4):467-80.
- [5] Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993; 64(5):456-60.
- [6] Bølling AK, Samuelsen JT, Morisbak E, Ansteinsson V, Becher R, Dahl JE, et al. Dental monomers inhibit LPS - induced cytokine release from the macrophage cell line RAW264.7. *Toxicol Lett*. 2013 Feb;216(2-3):130-8.
- [7] Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan;15(1):47-60.
- [8] Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014 Feb;64(1):57-80.
- [9] Chang HH, Chang MC, Lin LD, Lee JJ, Wang TM, Huang CH, et al. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(27):6917-25.

- [10] Cox CF, Sübay RK, Suzuki S, Suzuki SH, Ostro E. Biocompatibility of various dental materials: Pulp Healing with a surface seal. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1996 Jun;16(3):240-51.
- [11] de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater*. 2006 Oct;22(10):954-62.
- [12] de Souza PE, Gomez RS, Xavier GM, dos Santos JS, Gollob KJ, Dutra WO. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. *J Oral Pathol Med*. 2005 May;34(5):312-7.
- [13] Eckhardt A, Harorli T, Limtanyakul J, Hiller KA, Bosl C, Bolay C, et al. Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(9):1665-74.
- [14] Emmler 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 Dec;24(12):1670-5.
- [15] Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Schöller-Guinard M, et al. Insertional Inactivation of *pac* and *rmIB* Genes reduces the release of tumor necrosis factor Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):5169-77.
- [16] Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*. 1994 Jul;21(4):441-52.
- [17] Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater*. 2006 Mar;22(3):211-22.

- [18] Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. J Dent. 1996 Jan-Mar;24(1-2):125-8.
- [19] Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(3):333-55.
- [20] Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.
- [21] Gregson K, Beiswanger AJ, Platt J. The impact of sorption, buffering, and proteins on leaching of organic and inorganic substances from dental resin core material. J Biomed Mater Res A. 2008 Jan;84(1):256-64.
- [22] Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. Infect Immun. 2000 Dec;68(12):6785-9.
- [23] Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. J Dent Res. 1991;70(11):1450-5.
- [24] Hebling J, Giro EM, Costa CA. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. J Dent. 1999;27(8):557-64.
- [25] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology. 2005 May;115(1):1-20.
- [26] Hong SW, Baik JE, Kang SS, Yun CH, Seo DG, Han SH. Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. Mol Immunol. 2014 Feb;57(2):284-91.

- [27] Hungness ES, Pritts TA, Luo GJ, Sun X, Penner CG, Hasselgren PO. The transcription factor activator protein-1 is activated and interleukin-6 production is increased in interleukin-1 β -stimulated human enterocytes. *Shock*. 2000 Sep;14(3):386-91.
- [28] Izutani N, Imazato S, Nakajo K, Takahashi N, Takahashi Y, Ebisu S, et al. Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism. *Eur J Oral Sci*. 2011 Apr;119(2):175-81.
- [29] Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(2):179-200.
- [30] Kim RH, Williams DW, Bae S, Lee RS, Oh JE, Mehrazarin S, et al. Camphorquinone inhibits odontogenic differentiation of dental pulp cells and triggers release of inflammatory cytokines. *J Endod*. 2013 Jan;39(1):57-61.
- [31] Kong N, Jiang T, Zhou Z, Fu J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dent Mater*. 2009 Nov;25(11):1371-5.
- [32] Lanza CR, Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*. 2009;25(6):533-43.
- [33] Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater*. 2006 Dec;22(12):1086-92.
- [34] Lu HX, Xiao MZ, Niu ZY, Guo XM, Zhao SL, Wang HG, et al. Effect of IL-1 α on human dental pulp cells and pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2002 Oct;35(10):807-11.

- [35] Lygre H, Vorland M, Holmsen H. Interaction of a dental filling material eluate and membrane lipids. *Clin Oral Investig*. 2001 Sep;5(3):167-71.
- [36] Mendonça AA, Souza PP, Costa CA. Cytotoxic effects of harding cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Oct;104(4):e102-e8.
- [37] Munksgaard EC, Peutzfeldt A, Asmussen E. Elution of TEGDMA and BisGMA from a resin and a resin composite cured with halogen or plasma light. *Eur J Oral Sci*. 2000 Aug;108(4):341-5.
- [38] Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3313-7.
- [39] Nemoto H, Nakano K, Nomura R, Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the valve of an infective endocarditis patient. *J Med Microbiol*. 2008 Jul;57(Pt 7):891-5.
- [40] Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res*. 2002 Apr;81(4):265-9.
- [41] Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the “total etch” technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent*. 1998;11:S45-54.
- [42] Petković AB, Matić SM, Stamatović NV, Vojvodić DV, Todorović TM, Lazić ZR, et al. Proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and chemokines (IL-8 and MIP-1 α) as markers of periimplant tissue condition. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 May;39(5):478-85.

- [43] Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor in normal and inflamed human dental pulps. Arch Med Res. 2002 Sep-Oct;33(5):482-4.
- [44] Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. J Endod. 1998 Aug;24(8):528-33.
- [45] Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. J Endod. 1999 Feb;25(2):114-7.
- [46] Rueggeberg FA, Caughman WF, Chan DC. Novel approach to measure composite conversion kinetics during exposure with stepped or continuous light-curing. J Esthet Dent. 1999;11(4):197-205.
- [47] 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(2):136-51.
- [48] Schmalz G, Krifka S, Schweikl H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers. Adv Dent Res. 2011 Jul;23(3):302-6.
- [49] Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. Eur J Oral Sci. 2000 Oct;108(5):442-8.
- [50] Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. Biomaterials. 2005 May;26(14):1713-9.
- [51] Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. Dent Mater. 2007 Jun;23(6):688-95.

- [52] Sideridou ID, Achilias DS. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Jul;74(1):617-26.
- [53] 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 Mar;31(8):2010-4.
- [54] Vahid A, Hadjati J, Kermanshah H, Ghabraei S. Effects of cured dentin bonding materials on human monocyte viability. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Nov;98(5):619-21.
- [55] Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2006 Jun;22(6):499-505.
- [56] Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil*. 2008;35(12):940-6.
- [57] Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression--part of host defence in pulpitis. *Cytokine*. 2003 May;22(3-4):84-8.

Figures

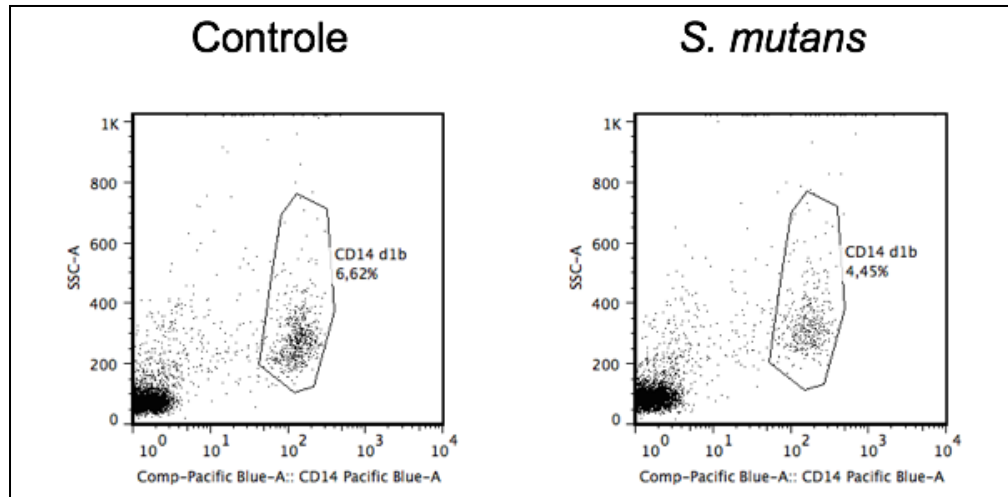


Figure 1 - The population of CD14⁺ monocytes in the Control and *S. mutans* (Sm) groups selected on the granulosity versus CD14 dot plot graph.

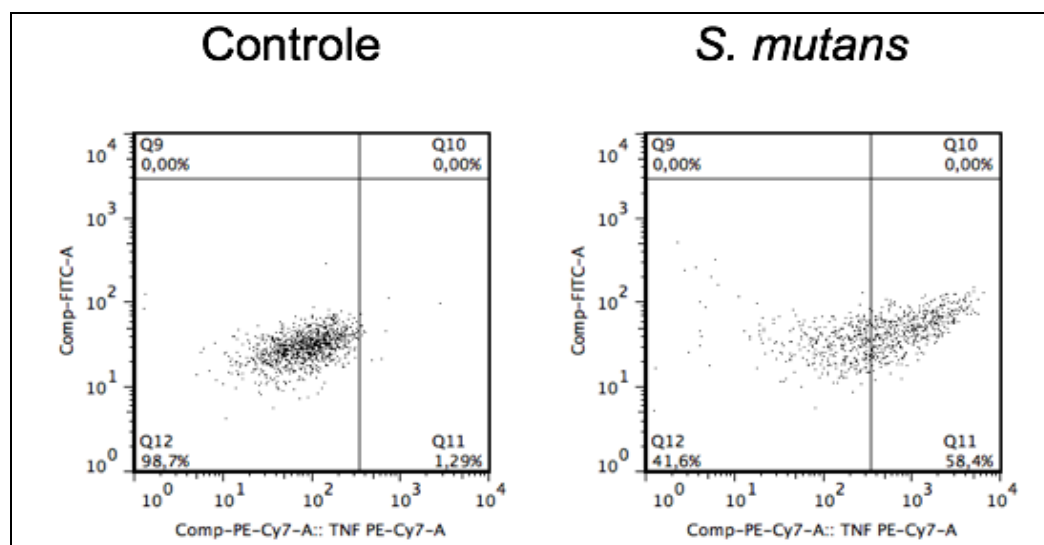


Figure 2 - Dot plot graph showing the percentage of TNF positive cells within the CD14+ monocyte population in the Control and *S. mutans* (Sm) groups.

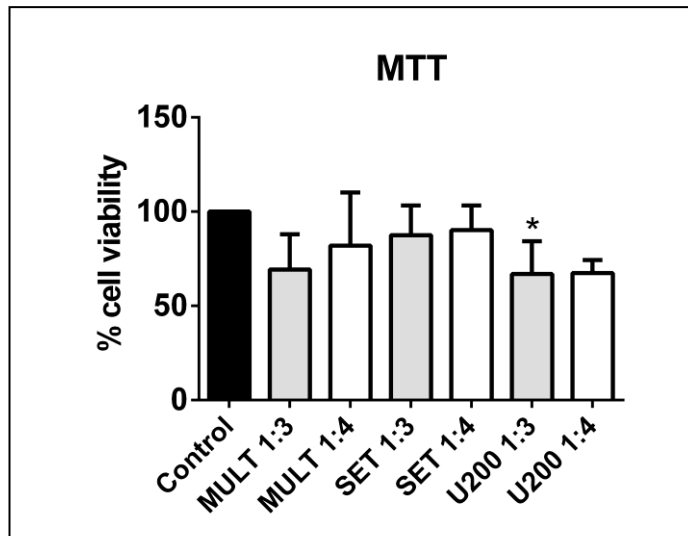


Figure 3 - Cell viability by the MTT method of PBMC exposed to different concentrations of supernatants from resin cements.

Results expressed as mean percentages of viability in relation to the control group.

Error bars indicate standard deviation.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control (one-way ANOVA with repeated measures, followed by Tukey's test).

Sm (*S. mutans*); MULT (MultilinkSpeed, Ivoclar); SET (seT PP, SDI); U200 (RelyXTM U200, 3M/ESPE).

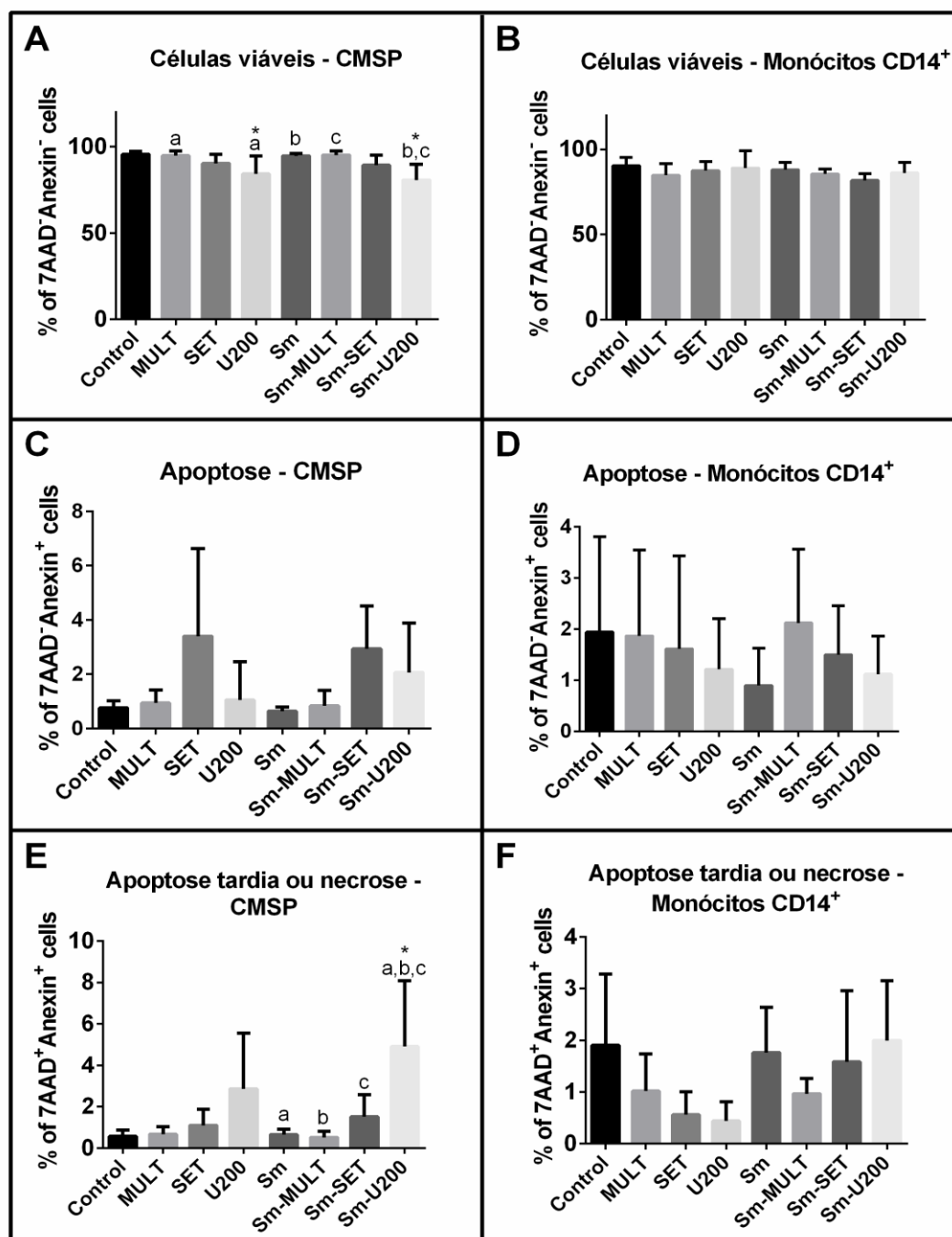


Figure 4 - Percentage of viable cells (double-negative for 7-AAD and Annexin V) in the PBMC population (A) and CD14⁺ monocytes (B); percentage of cells in apoptosis (7-AAD⁺Annexin V⁺) in the PBMC population (C) and CD14⁺ monocytes (D); percentage of cells in late apoptosis or necrosis (7-AAD⁺Annexin V⁺) in the PBMC (E) and CD14⁺ monocytes (F).

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control and identical letters represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups (one-way ANOVA with repeated measures, followed by the Tukey test).

Error bars indicate standard deviation.

Sm (*S. mutans*); MULT (MultlinkSpeed, Ivoclar); SET (SeT PP, SDI); U200 (RelyX[™] U200, 3M ESPE).

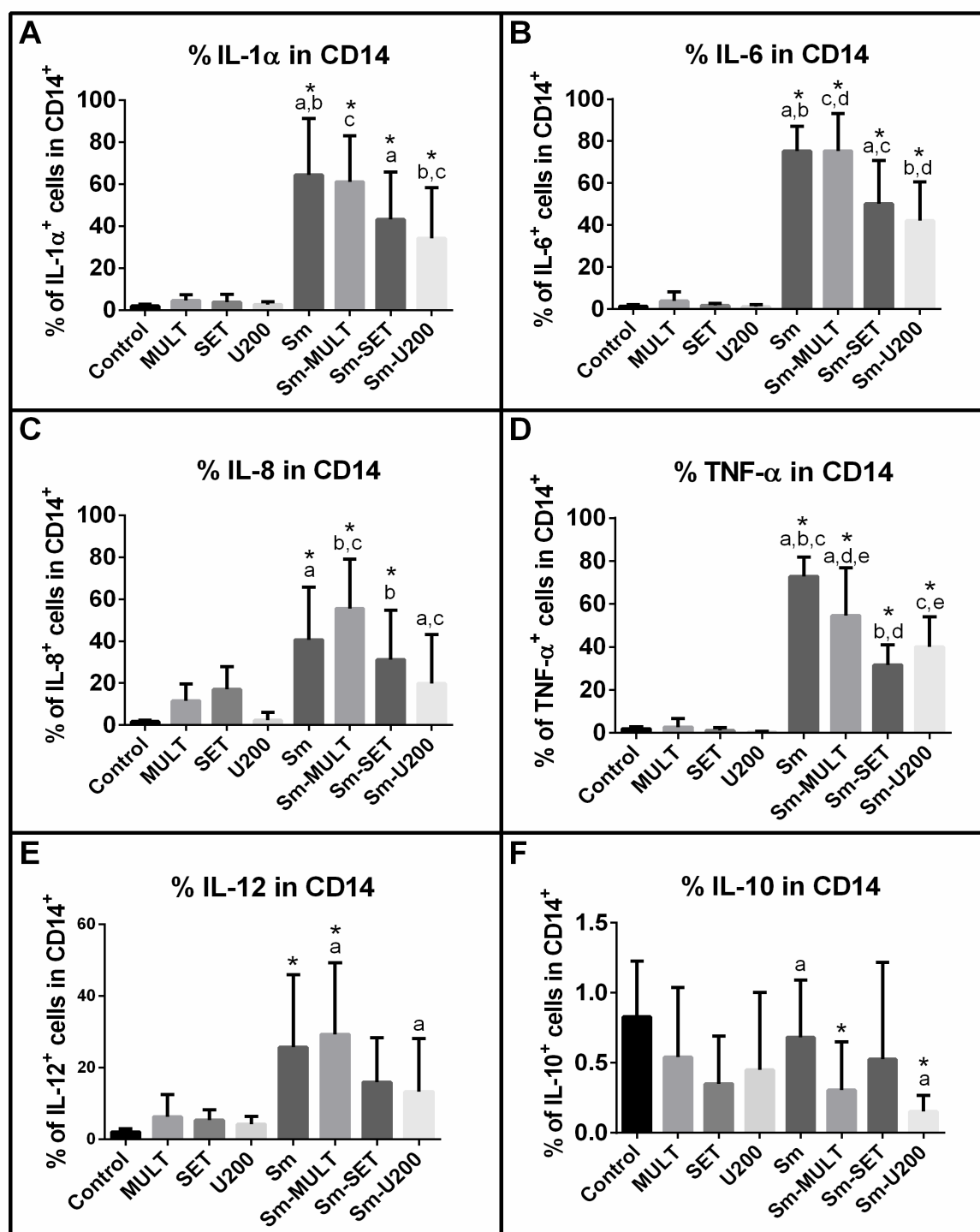


Figure 5 - Figure 5 - Percentage of IL-1 α (A), IL-6 (B), IL-8 (C), TNF- α (D), IL-12 (E) and IL-10 positive cells in the population of CD14⁺ monocytes, after stimulation with *S. mutans* and/or supernatant of the resin cements.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control and identical letters represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups (one-way ANOVA with repetition, followed by the Tukey test).

Error bars indicate standard deviation.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a sensibilidade a atenuação da transmissão de luz através de cerâmicas para conversão de monômeros varia entre diferentes cimentos resinosos duais, o que pode interferir nas propriedades físico-químicas dos mesmos, principalmente nos primeiros minutos após cimentação de restaurações.

Nossos dados sugerem que os efeitos biológicos, tanto na viabilidade celular quanto na produção de citocinas por células imunocompetentes estimuladas por *S. mutans*, não dependem diretamente do grau de conversão dos monômeros resinosos nas fases iniciais de polimerização. Embora U200 tenha apresentado maior grau de conversão de monômeros já nos primeiros 5 minutos após fotopolimerização através da cerâmica e.max® e mantido níveis de conversão próximos aos demais cimentos após 24 horas, seus produtos liberados no meio de cultura nas primeiras 24 horas causaram maiores efeitos na viabilidade celular de CMSP e na produção de citocinas por monócitos, quando comparado a SET e MULT.

REFERENCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.

ACQUAVIVA, P.A. et al. Degree of conversion of three composite materials employed in the adhesive cementation of indirect restorations: a micro-Raman analysis. **Journal of Dentistry**, v.37, n.8, p. 610-615, Aug. 2009.

AGUIAR, T.R. et al. Influence of curing mode and time on degree of conversion of one conventional and two self-adhesive resin cements. **Operative Dentistry**, v.35, n.3, p. 295-299, May/June 2010.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, n.4, p. 783-801, Feb. 2006.

ANDRZEJEWSKA, E. Kinetics of network formation during photo polymerization. **Transactions of the Academy of Dental Materials**, v.18, p. 69-80, 2004.

ANDRZEJEWSKA, E. Photopolymerization kinetics of multifunctional monomers. **Progress in Polymer Science**, v.26, n.4, p. 605-665, May 2001.

ANUSAVICE, K. **Philips' Science of dental materials**. 11th ed. St. Louise: Saunders, 2003. 832p.

ARCHEGAS, L.R.P. et al. Effect of ceramic veneer opacity and exposure time on the polymerization efficiency of resin cements. **Operative Dentistry**, v.37, n.3, p. 281-289, May/June 2012.

ARIMA, T.; MURATA, H.; HAMADA, T. The effects of cross-linking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.23, n.7, p. 476-481, July 1996.

AROSSI, G.A. Implicações biológicas de monômeros de odontológico. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.11, n.35, p. 45-55, jan./mar. 2013.

ARRAIS, C.A. et al. Effect of curing mode on the polymerization characteristics of dual-cured resin cement systems. **Journal of Dentistry**, v.36, n.6, p. 418-426, June 2008.

ASMUSSEN, E.; PEUTZFELDT, A. Influence of composition on rate of polymerization contraction of light-curing resin composites. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.60, n.3, p. 146-150, June 2002.

AWAD, D. et al. Translucency of esthetic dental restorative CAD / CAM materials and composite resins with respect to thickness and surface roughness. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.113, n.6, p. 534-540, June 2015.

BAGIS, Y.H.; RUEGGERBERG, F.A. The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. **Dental Materials**, v.16, n.4, p. 244-247, July 2000.

BAILEY, L.O.; WEIR, M.D.; WASHBUM, N.R. Quantification of macrophage viability and inflammatory response to dental bonding resins. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.21, n.3, p. 185-206, May 2006.

BAKOPOULOU, A. et al. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v.672, n.2, p. 103-112, Jan. 2009.

BALADHANDAYUTHAM, B.; LAWSON, N.C.; BURGESS, J.O. Fracture load of ceramic restorations after fatigue loading. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.114, n.2, p. 266-271, Aug. 2015.

BEHR, M. et al. Marginal adaptation in dentin of a self-adhesive universal resin cement compared with well-tried systems. **Dental Materials**, v.20, n.2, p. 191-197, Feb. 2004.

BENABDELMOUMENE, S. et al. Activation of human monocytes by Streptococcus mutans serotype f polysaccharide: immunoglobulin G Fc receptor expression and tumor necrosis factor and interleukin-1 production. **Infection and Immunity**, v.59, n.9, p. 3261-3266, Sept. 1991.

BERGENHOLZ, G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.11, n.4, p. 467-480, 2000.

BHAKDI, S. et al. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. **Infection and Immunity**, v.59, n.12, p. 4614-4620, Dec. 1991.

BINDL, A.; LÜTHY, H.; MÖRMANN, W.H. Strength and fracture pattern of monolithic cad/cam-generated posterior crowns. **Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials**, v.22, n.1, p. 29-36, Jan. 2006.

BJØRNDAL, L.; MJÖR, I.A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries - Characteristics of lesions and pulpal reaction. **Quintessence International**, v.32, n.9, p. 717-736, Oct. 2001.

BOUILLAGUET, S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.15, n.1, p. 47-60, Jan. 2004.

BOUILLAGUET, S.J. et al. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. **Journal of Endodontics**, v.22, n.5, p. 244-248, 1996.

BRAGA, R.R.; CESAR, P.F.; GONZAGA, C.C. Mechanical properties of resin cements with different activation modes. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.29, n.3, p. 257-262, Mar. 2002.

BRAGA, R.R.; FERRACANE, J.L. Alternatives in polymerization contraction stress management. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.15, n.3, p. 176-184, June 2004.

BRECKER, S.C. Aluminous porcelain, a new strong ceramic material for esthetic restorations. **Dental Digest**, v.73, p. 444-448, 1967.

BRODBELT, R.H. et al. Translucency of human dental enamel. **Journal of Dental Research**, v.60, n.10, p. 1749-1753, Oct. 1981.

BRODBELT, R.H.; O'BRIEN, W.J.; FAN, P.L. Translucency of dental porcelains. **Journal of Dental Research**, v.59, n.1, p. 70-75, Jan. 1980

CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009. 323p.

CANTORO, A. et al. Influence of ultrasound application on inlays luting with self-adhesive resin cements, **Clinical Oral Investigations**, v.15, n.5, p. 617-623, Oct. 2011.

CAUGHMAN, W.F. et al. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. **Biomaterials**, v.12, n.8, p. 737-740, Oct. 1991.

CAUGHMAN, W.F.; CHAN, D.C.N.; RUEGGERBERG, F.A. Curing potential of dual-polymerizable resin cements in simulated clinical situations. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.86, n.1, p. 101-106, July 2001.

CAVALCANTI, B.N. et al. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. **Brazilian Oral Research**, v.25, n.1, p. 13-18, Jan./Feb. 2011.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology** 2000, v.64, n.1, p. 57-80, Feb. 2014.

CHAN, K.C.; BOYER, D.B. Curing light-activated composite cement through porcelain. **Journal of Dental Research**, v.68, n.3, p. 479-480, Mar. 1989.

CHANG, H.H. et al. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. **Biomaterials**, v.31, n.27, p. 6917-6925, Sept. 2010.

CHANG, M.C. et al. Cytokine induced prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 expression in dental pulp cells: downstream calcium signalling via activation of prostaglandin EP receptor. **International Endodontic Journal**, v.39, n.10, p. 819-826, Oct. 2006.

CHIA, J.S. et al. Induction of cytokines by glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.4, p. 892-897, July 2002.

CLEVELAND, M.G. et al. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. **Infection and Immunity**, v.64, n.6, p. 1906-1912, June 1996.

COOPER, P.R.; HOLDER, M.J.; SMITH, A.J. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. **Journal of Endodontics**, v.40, Suppl.4, p. S46-51, 2014.

CORCIOLANI, G. et al. Color match of two different ceramic systems to selected shades of one shade guide. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.105, n.3, p. 171-176, Mar. 2011.

COX, C.F. et al. Biocompatibility of various dental materials: Pulp Healing with a surface seal. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v.16, n.3, p. 240-251, June 1996.

D'ARCANGELO, C. et al. Five-year retrospective clinical study of indirect composite restorations luted with a light-cured composite in posterior teeth. **Clinical Oral Investigations**, v.18, n.2, p. 615-624, 2014.

DE MUNCK, J. et al. Bonding of an auto-adhesive luting material to enamel and dentin. **Dental Materials**, v.20, n.10, p. 963-971, Dec. 2004.

DE MUNCK, J. et al. Fatigue resistance of dentin/composite interfaces with an additional intermediate elastic layer. **European Journal of Oral Sciences**, v.113, n.1, p. 77-82, Feb. 2005.

DELLA BONA, A.; ANUSAVICE, K.J. Microstructure, composition, and etching topography of dental ceramics. **The International Journal of Prosthodontics**, v.15, n.2, p. 159-167, Mar./Apr. 2002.

DELLA BONA, A.; KELLY, J.R. The clinical success of all-ceramic restorations. **Journal of the American Dental Association**, v.139, Suppl, p. 8S-13S, Sept. 2008.

DELLA BONA, A.; NOGUEIRA, A.D.; PECHO, O.E. Optical properties of CAD-CAM ceramic systems. **Journal of Dentistry**, v.42, n.9, p. 1202-1209, Sept. 2014.

DEMIRCI, M. et al. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and nontoxicity by dental adhesives. **Dental Materials**, v.24, n.3, p. 362-371, Mar. 2008.

DeWALD, J.P.; FERRACANE, J.L. A comparison of four modes of evaluating depth of cure of light-activated composites. **Journal of Dental Research**, v.66, n.3, p. 727-730, Mar. 1987.

DIAS, M.C. et al. UV-Vis spectrophotometric analysis and light irradiance through hot-pressed and hot-pressed-veneered glass ceramics. **Brazilian Dental Journal**, v.19, n.3, p. 197-203, 2008.

DURAND, S.H. et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. **Journal of Immunology**, v.176, n.5, p. 2880-2887, Mar. 2006.

ECKARDT, A. et al. Inhibition of cytokine and surfasse antigen expression in LPS stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. **Biomaterials**, v.30, n.9, p. 1665-1674, Mar. 2009.

ELIADES, A. et al. Self-adhesive restoratives as pit and fissure sealants : A comparative laboratory study. **Dental Materials**, v.29, n.7, p. 752-762, July 2013.

EMMLER, J. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. **Dental Materials**, v.24, n.12, p. 1670-1675, Dec. 2008.

ENGELS-DEUTSCH, M. et al. Insertional Inactivation of *pac* and *rmIB* Genes reduces the release of tumor necrosis factor Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic. **Infection and Immunity**, v.71, n.9, p. 5169-5177, Sept. 2003.

FABIANELLI, A. et al. A clinical trial of Empress II porcelain inlays luted to vital teeth with a dual-curing adhesive system and a self-curing resin cement. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v.8, n.6, p. 427-431, Dec. 2006

FALCONI, M. et al. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. **Cell Biology and Toxicology**, v.23, n.5, p. 313-322, Sept. 2007.

FARGES, J.C. et al. Cytokine production by human odontoblastlike cells upon Toll-like receptor-2 engagement. **Immunobiology**, v.216, n.4, p. 513-517, Apr. 2011.

FERRACANE, J.L. Correlation between hardness and degree of conversion during the setting reaction of unfilled dental restorative resins. **Dental Materials**, v.1, n.1, p. 11-14, Feb. 1985.

FERRACANE, J.L. Elution of leachable components from composites. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.21, n.4, p. 441-452, July 1994.

FERRACANE, J.L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dental Materials**, v.22, n.3, p. 211-222, Mar. 2006.

FERRACANE, J.L.; CONDON, J.R. In vitro evaluation of the marginal degradation of dental composites under simulated occlusal loading. **Dental Materials**, v.15, n.4, p. 262-267, July 1999.

FERRACANE, J.L.; MOSER, J.B.; GREENER, E.H. Ultraviolet light-induced yellowing of dental restorative resins. **Journal of Dental Research**, v.60, n.9, p. 1678-1685, Sept. 1981.

FLURY, S. et al. Light curing through glass ceramics : effect of curing mode on micromechanical properties of dual-curing resin cements. **Clinical Oral Investigations**, v.18, n.3, p. 809-818, Apr. 2014.

FLURY, S.; LUSSI, A.; HICKEL, R. Light curing through glass ceramics with a second- and a third- generation LED curing unit : effect of curing mode on the degree

of conversion of dual-curing resin cements. **Clinical Oral Investigations**, v.17, n.9, p. 2127-2137, Dec. 2013.

FONSECA, R.G. et al. Evaluation of polymerization progression of resin cements in light absence. **Journal of Dental Research**, v.80, n.4, p. 1106-1106, Apr. 2001.

FRASSETTO, A. et al. Kinetics of polymerization and contraction stress development in self-adhesive resin cements. **Dental Materials**, v.28, n.9, p. 1032-1039, Sept. 2012.

GERZINA, T.M.; HUME, W.R. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. **Journal of Dentistry**, v.24, n.1-2, p. 125-128, Jan./Mar. 1996.

GEURTSEN, W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.11, n.3, p. 333-355, 2000.

GIANINI, M. et al. Characterization of water sorption, solubility and roughness of silorane and methacrylate-based composite resins. **Operative Dentistry**, v.39, n.3, p. 264-272 May/June 2014.

GONÇALVES, L. et al. Solubility, salivary sorption and degree of conversion of dimethacrylate-based polymeric matrixes. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.85, n.2, p. 320-325, May 2008.

GONZAGA, C.C. et al. Slow crack growth and reliability of dental ceramics. **Dental Materials**, v.27, n.4, p. 394-406, Apr. 2011.

GREGSON, K. et al. The impact of sorption, buffering, and proteins on leaching of organic and inorganic substances from dental resin core material. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.84, n.1, p. 256-264, Jan. 2008.

GUARDA, G.B. et al. Luting glass ceramic restorations using a self-adhesive resin cement under different dentin conditions. **Journal of Applied Oral Science**, v.18, n.3, p. 244-248, May/June 2010.

HAHN, C.L.; BEST, A.M.; TEW, J.G. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.68, n.12, p. 6785-6789, Dec. 2000.

HAHN, C.L.; FALKLER Jr., W.A.; MINAH, G.E. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. **Archives of Oral Biology**, v.36, n.2, p. 147-153, 1991.

HAHN, C.L.; FALKLER Jr., W.A.; SIEGEL, M.A. A study of T and B cells in pulpal pathosis. **Journal of Endodontics**, v.15, n.1, p. 20-26, Jan. 1989.

HARGREAVES, K.M.; GOODIS, H.E. **Polpa dentária de Seltzer e Bender**. São Paulo: Quintessence, 2009. 501p.

HASEGAWA, E.A.; BOYER, D.B.; CHAN, D.C. Hardening of dual-cured cements under composite resin inlays. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.66, n.2, p. 187-192, Aug, 1991.

HEFFERNAN, M.J. et al. Relative translucency of six all-ceramic systems. Part II: core and veneer materials. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.88, n.1, p. 10-5, July 2002.

HIRAO, K. et al. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. **Journal of Dental Research**, v.88, n.8, p. 762-767, Aug. 2009.

HONG, S.W. et al. Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. **Molecular Immunology**, v.57, n.2, p. 284-291, Feb. 2014.

HORST, O.V. et al. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. **BMC Immunology**, v.12, n.9, 2011.

ILIE, N.; HICKEL, R. Correlation between ceramics translucency and polymerization efficiency through ceramics. **Dental Materials**, v.24, n.7, p. 908-914, July 2008.

ISGRÓ, G.; ADDISON, O.; FLEMING, G.J. Transient and residual stresses in a pressable glass-ceramic before and after resin-cement coating determined using profilometry. **Journal of Dentistry**, v.39, n.5, p. 368-375, May 2011.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v.5, n.10, p. 987-995, Oct. 2004.

JANEWAY Jr., C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v.20, p. 197-216, 2002.

JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in Microbiology**, v.13, n.12, p. 589-595, Dec. 2005.

JIANG, S. et al. Effect of the biofilm age and starvation on acid tolerance of biofilm formed by *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free adults. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.4, pii: E713, Mar. 2017.

JONTELL, M. et al. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.9, n.2, p. 179-200, 1998

JONTELL, M.; GUNRAJ, M.N.; BERGENHOLTZ, G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. **Journal of Dental Research**, v.66, n.6, p. 1149-1153, June 1987.

KELLER, R. et al. Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. **Infection and Immunity**, v.60, n.9, p. 3664-3672, Sept. 1992.

KELLER, R.; GEHRI, R.; KEIST, R. Macrophage response to viruses, protozoa, and fungi: secretory and cellular activities induced in resting unprimed bone marrow-

derived mononuclear phagocytes. **Cellular Immunology**, v.159, n.2, p. 323-330, Dec. 1994.

KELLY, J.R. Dental ceramics: current thinking and trends. **Dental Clinics of North America**, v.48, n.2, p. 513-530, Apr. 2004.

KOKKAS, A.B. et al. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor alpha gene expression in human pulp. **International Endodontic Journal**, v.40, n.3, p. 198-203, 2007.

KOKUBO, T. **Bioceramics and their clinical applications**. Florida: CRC Press llc, 2008. 760p.

KRÄMER, N. et al. Four-year clinical performance and marginal analysis of pressed glass ceramic inlays luted with ormocer restorative vs. conventional luting composite. **Journal of Dentistry**, v.37, n.11, p. 813-819, Nov. 2009

KRIFKA, S. et al. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. **Biomaterials**, v.31, n.11, p. 2964-2975, Apr. 2010.

KUAN, Y.H. et al. The upregulation of tumour necrosis factor- α and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate. **International Endodontic Journal**, v.45, n.7, p. 619-626, July 2012.

KUMBULOGLU, O. et al. A study of the physical and chemical properties of four resin composite luting cements. **The International Journal of Prosthodontics**, v.17, n.3, p. 357-363, May/June 2004.

LEE, D.H. et al. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. **Dental Materials**, v.22, n.12, p. 1086-1092, Dec. 2006.

LERTCHIRAKARN, V.; BIRNER, R.; MESSER, H.H. Effects of interleukin-1 β on human pulpal fibroblasts proliferation and collagen synthesis. **Journal of Endodontics**, v.24, n.6, p. 409-413, June 1998

LEVY, R. et al. Stimulation of oxidative burst in human monocytes by lipoteichoic acids. **Infection and Immunity**, v.58, n.2, p. 566-568, Feb. 1990.

LI, M.Y.; WANG, J.; LAI, G.Y. Effect of a dentifrice containing the peptide of streptococcal antigen I/II on the adherence of mutans streptococcus. **Archives of Oral Biology**, v.54, n.11, p. 1068-1073, Nov. 2009.

LIN, W.S. et al. The effect of core material, veneering porcelain, and fabrication technique on the biaxial flexural strength and weibull analysis of selected dental ceramics. **Journal of Prosthodontics**, v.21, n.5, p. 353-362, July 2012.

LOGUERCIO, A.D. et al. A 36-month evaluation of self-etch and etch-and-rinse adhesives in noncarious cervical lesions. **Journal of the American Dental Association**, v.138, n.4, p. 507-514, Apr. 2007.

LU, H.X. et al. Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. **International Endodontic Journal**, v.35, n.10, p. 807-811, Oct. 2002.

LYGRE, H.; VORLAND, M.; HOLMSEN, H. Interaction of a dental filling material eluate and membrane lipids. **Clinical Oral Investigation**, v.5, n.3, p. 167-171, Sept. 2001.

MACIEL, K.F. et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. **International Endodontic Journal**, v.45, n.4, p. 354-362, Apr. 2012.

MAGNE, P.; PARANHOS, M.P.; SCHLICHTING, L.H. Influence of material selection on the risk of inlay fracture during pre-cementation functional occlusal tapping. **Dental Materials**, v.27, n.2, p. 109-113, Feb. 2011.

MANCUSO, G. et al. Anti-lipoteichoic acid antibodies enhance release of cytokines by monocytes sensitized with lipoteichoic acid. **Infection and Immunity**, v.62, n.4, p. 1470-1473, Apr. 1994.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v.25, n.12, p. 677-686, Dec. 2004.

MARTINS, L.M. et al. Biomechanical behavior of dental ceramics: review. **Cerâmica**, v.56, n.338, p. 148-155, Apr./June 2010.

MENG, X.; YOSHIDA, K.; ATSUTA, M. Influence of ceramic thickness on mechanical properties and polymer structure of dual-cured resin luting agents. **Dental Materials**, v.24, n.5, p. 594-599, May 2008.

MORAES, R.R. et al. Impact of immediate and delayed light activation on self-polymerization of dual-cured dental resin luting agents. **Acta Biomaterialia**, v.5, n.6, p. 2095-2100, July 2009.

MUNKSGAARD, E.C.; PEUTZFELDT, A.; ASMUSSEN, E. Elution of TEGDMA and BisGMA from a resin and a resin composite cured with halogen or plasma light. **European Journal of Oral Sciences**, v.108, n.4, p. 341-345, Aug. 2000.

MYERS, M.L.; CAUGHMAN, W.F.; RUEGGERBERG, F.A. Effect of restoration composition, shade, and thickness on the cure of a photo activated resin cement. **Journal of Prosthodontics**, v.3, n.3, p. 149-157, Sept. 1994.

NAGATA, E.; OHO, T. Invasive *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokine production in human aortic endothelial cells via regulation of intracellular toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain 2. **Molecular Oral Microbiology**, v.32, n.2, p. 131-141, Apr. 2017.

NANCI, A. **Ten cate's oral histology: development, structure, and function**. 6. ed. St. Louis: Mosby, 2003.

NODA, M. et al. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. **Journal of Dental Research**, v.81, n.4, p. 265-269, Apr. 2002.

NODA, M. et al. Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF- a secretion of THP-1 monocytes. **Dental Materials**, v.19, n.2, p. 101-105, Mar. 2003.

NORONHA FILHO, J.D. et al. A critical analysis of the degree of conversion of resin-based luting cements. **Journal of Applied Oral Science**, v.18. n.5, p. 442-446, Sept./Oct. 2010.

OLEA, N. et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. **Environmental Health Perspectives**, v.104, n.3, p. 298-305, Mar. 1996.

OLSSON, K.G. et al. A long-term retrospective and clinical follow-up study of In-Ceram Alumina FPDs. **The International Journal of Prosthodontics**, v.16, n.2, p. 150-156, Mar./Apr. 2003.

OHSIMA, H. et al. Responses of immunocompetent cells to cavity preparation in rat molars: an immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. **Connective Tissue Research**, v.32, n.1-4, p. 303-311, 1995.

PAPAZPGLOU, E.; RAHIOTIS, C.; KAKABOURA, A. Curing efficiency of a photo-and dual-cured resin cement polymerized through 2 ceramics and a resin composite. **The International Journal of Prosthodontics**, v.19, n.1, p. 34-36, Jan. 2006.

PARK, S.H. Comparison of degree of conversion for light-cured and additionally heat-cured composites. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.76, n.6, p. 613-618, Dec. 1996.

PASHLEY, D.H. Dynamics of the pulpo-dentin complex. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.7, n.2, p. 104-133, 1996.

PAVAN, S.; BERGER, S.; BEDRAN-RUSSO, A.K.B. The effect of dentin pretreatment on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.104, n.4, p. 258-264, Oct. 2010.

PEIXOTO et al. Light transmission through porcelain. **Dental Materials**, v.23, n.11, p. 1363-1368, Nov. 2007.

PETKOVIĆ, A.B. et al. Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of periimplant tissue condition. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.39, n.5, p. 478-485, May 2010.

PEUTZFELDT, A.; ASMUSSEN, E. Influence of eugenol-containing temporary cement on efficacy of dentin-bonding systems. **European Journal of Oral Sciences**, v.107, n.1, p. 65-69, Feb. 1999

PEZELJ-RIBARIC, S. et al. Detection of tumor necrosis factor in normal and inflamed human dental pulps. **Archives of Medical Research**, v.33, n.5, p. 482-484, Sept./Oct. 2002.

PIANELLI, C. et al. The micro-raman spectroscopy, a useful tool to determine the degree of conversion of light-activated composite resins. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.48, n.5, p. 675-681, 1999.

PISANI-PROENCA, J. et al. Influence of ceramic surface conditioning and resin cements on microtensile bond strength to a glass ceramic. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.96, n.6, p. 412-417, Dec. 2006.

PLITNICK, L.M. et al. Inhibition of interleukin-2 by a Gram-positive bacterium, *Streptococcus mutans*. **Immunology**, v.95, n.4, p. 522-528, Dec. 1998.

PLITNICK, L.M. et al. Lipoteichoic acid inhibits interleukin-2 (IL-2) function by direct binding to IL-2. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.5, p. 972-979, Sept. 2001.

RADOVIC, I. et al. Self-adhesive resin cements: a literature review. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v.10, n.4, p. 251-258, Aug. 2008.

RAKICH, D.R. et al. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. **Journal of Endodontics**, v.25, n.2, p. 114-117, Feb. 1999.

RAKICH, D.R. et al. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. **Journal of Endodontics**, v.24, n.8, p. 528-533, Aug. 1998.

RASETTO, F.H. et al. Light transmission through all-ceramic dental materials: a pilot study. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.91, n.5, p. 441-446, May 2000.

REIS, A. et al. Can the durability of one-step-etch adhesives be improved by double application or by an extra layer of hydrophobic resin? **Journal of Dentistry**, v.36, n.5, p. 209-315, May 2008.

ROA, N.S.; GÓMEZ, S.I.; RODRÍGUEZ, A. Cytokines produced by CD4+ T cells against a synthetic GTF-I(1301-1322) peptide of *Streptococcus mutans* in naturally sensitized humans. **Acta Odontologica Latinoamericana**, v.21, n.2, p. 153-158, 2008.

ROSENSTIEL, S.F.; LAND, M.F.; CRISPIN, B.J. Dental luting agents: a review of the current literature. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.80, n.3, p. 280-301, Sept. 1998.

RUEGGEBERG, F.A.; CAUGHMAN, W.F.; CHAN, D.C.N. Novel approach to measure composite conversion kinetics during exposure with stepped or continuous light-curing. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v.11, n.4, p. 197-205, July 1999.

RUEGGEBERG, F.A.; CAUGHMAN, W.F.; CURTIS Jr., J.W. Effect of light intensity and exposure duration on cure of resin composite. **Operative Dentistry**, v.19, n.1, p. 26-32, Jan./Feb. 1994.

RUEGGEBERG, F.A.; CRAIG, R.G. Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. **Journal of Dental Research**, v.67, n.6, p. 932-937, June 1988.

RUYTER, I.E.; NILNER, K.; MÖLLER, B. Color stability of dental composite resin materials for crown and bridge veneers. **Dental Materials**, v.3, n.5, p. 246-251, Oct. 1987.

SAKAGUCHI, R.L.; BERGE, H.X. Reduced light energy density decreases post-gel contraction while maintaining degree of conversion in composites. **Journal of Dentistry**, v.26, n.8, p. 695-700, Nov. 1998.

SANTERRE, J.P.; SHAJII, L.; LEUNG, B.W. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.12, n.2, p. 136-151, 2001.

SANTOS JÚNIOR, G.C. et al. Hardening of dual-cure resin cements and a resin composite restorative cured with QTH and LED curing units. **Journal Canadian Dental Association**, v.70, n.5, p. 323-328, May 2004.

SASAKI, T.; GARANT, P.R. Structure and organization of odontoblasts. **The Anatomical Record**, v.245, n.2, p. 235-249, June 1996.

SCHAFER, T.E. et al. Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.45, n.3, p. 192-197, June 1999.

SCHMALZ, G.; KRIFKA, S.; SCHWEIKL, H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers. **Advances in Dental Research**, v.23, n.3, p. 302-306, July 2011.

SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H.; HILLER, K.A. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. **European Journal of Oral Sciences**, v.108, n.5, p. 442-448, Oct. 2000.

SCHWEIKL, H. et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. **Biomaterials**, v.26, n.14, p. 1713-1719, May 2005.

SCHWEIKL, H. et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. **Dental Materials**, v.23, n.6, p. 688-695, June 2006.

SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G.; SPRUSS, T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. **Journal of Dental Research**, v.80, n.7, p. 1615-1620, July 2001.

SEGHI, R.R.; SORENSEN, J.A. Relative flexural strength of six new ceramic materials. **The International Journal of Prosthodontics**, v.8, n.3, p. 239-246, May/June 1995.

SEO, H.S.; MICHALEK, S.M.; NAHM, M.H. Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to gram-positive bacteria. **Infection and Immunology**, v.76, n.1, p. 206-213, Jan 2008.

SIDERIDOU, I.D.; ACHILIAS, D.S. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B**, v.74, n.1, p. 617-626, July 2005.

SILVA, A.C. et al. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. **Journal of Applied Oral Science**, v.17, n.5, p. 527-532, Sept./Oct. 2009.

SILVA, E.M. et al. Long-term degradation of resin-based cements in substances. **Journal of Applied Oral Science**, v.21, n.3, p. 271-277, 2013.

SOELL, M. et al. Binding of Streptococcus mutans SR protein to human monocytes: production of tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6. **Infection and Immunity**, v.62, n.5, p. 1805-1812, 1994.

SOUZA, P.E.A. et al. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.34, n.5, p. 312-317, May 2005.

SPAGNUOLO, G. et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. **Biomaterials**, v.27, n.9, p. 1803-1809, Mar. 2006.

STANDIFORD, T.J. et al. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p. 119-125, Jan. 1994.

STAQUET, M.J. et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. **Journal of Dental Research**, v.87, n.3, p. 256-261, 2008.

STEVENSON, B.; LBBETSON, R. The effect of the substructure on the colour of samples/ restorations veneered with ceramic: a literature review. **Journal of Dentistry**, v.38, n.5, p. 361-368, May 2010.

SUDA, Y. et al. Cytokine-inducing glycolipids in the lipoteichoic acid fraction from Enterococcus hirae ATCC 9790. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.12, n.2, p. 97-112, Oct. 1995.

SUN, A. CHIA, J.S.; CHIANG, C.P. Increased proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and T cells to *Streptococcus mutans* and glucosyltransferase D antigens in the exacerbation stage of recurrent aphthous ulcerations. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.101, n.8, p. 560-566, Aug. 2002.

TARLE, Z. et al. Composite conversion and temperature rise using a conventional, plasma arc, and an experimental blue LED curing unit. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.29, n.7, p. 662-667, July 2002.

TASKONAK, B.; MECHOLSKY Jr., J.J.; ANUSAVICE, K.J. Residual stresses in bilayer dental ceramic. **Biomaterials**, v.26, n.16, p. 3235-3241, June 2005.

THONEMANN, B. et al. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. **Dental Materials**, v.18, n.4, p. 318-323, June 2002.

UCTASLI, S.; HASANREISOGLU, U.; WILSON, H.J. The attenuation of radiation by porcelain and its effect on polymerization of resin cements. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.21, n.5, p. 565-575, Sept. 1994.

URCAN, E. et al. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. **Biomaterials**, v.31, n.8, p. 2010-2014, Mar. 2010.

Van MEERBEEK, B. et al. Dual cure luting composites – Part II: Clinically related properties. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.21, n.1, p. 57-66, Jan. 1994.

VEERAYUTTHWILAI, O. et al. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. **Oral Microbiology and Immunology**, v.22, n.1, p. 5-13, Feb. 2007.

VERNIER, A. et al. Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. **Infection and Immunity**, v.64, n.8, p. 3016-3022, Aug. 1996.

VICHI, A. et al. Color related to ceramic and zirconia restorations: a review. **Dental Materials**, v.27, n.1, p. 97-108, Jan. 2011.

VIOLA, A.; LUSTER, A.D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.48, p. 171-197, 2008.

WANG, P. et al. *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid-induced apoptosis in cultured dental pulp cells from human deciduous teeth. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.281, n.4, p. 957-961, 2001.

WATTS, D.C.; CASH, A.J. Analysis of optical transmission by 400-500 nm visible light into aesthetic dental biomaterials. **Journal of Dentistry**, v.22, n.2, p. 112-117, Apr. 1994.

WELLNER, P. et al. Cytokine release from human leukocytes exposed to silorane and methacrylate based dental materials. **Dental Materials**, v.28, p. 743-748, 2012

YAMAGUCHI, H. et al. Proinflammatory cytokines induce stromelysin-1-mediated cell proliferation in dental pulp fibroblast-like cells. **Journal of Endodontics**, v.40, n.1, p. 89-94, 2004.

YAN, Y.L. et al. Changes in degree of conversion and micro hardness of dental resin cements. **Operative Dentistry**, v.35, n.2, p. 203-210, Mar./Apr. 2010.

YANG, X. et al. Pro-inflammatory cytokines induce odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.113, n.2, p. 669-677, Feb. 2012.

YAP, A.U.J. et al. Comparative hardness and modulus of tooth-colored restoratives: a depth-sensing microindentation study. **Biomaterials**, v.25, n.11, p. 2179-2185, May 2004.

YEE, M. et al. Porphyromonas gingivalis stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GMSM-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells. **Anaerobe**, v.28, p. 62-67, 2014.

YOSHIE, O.; IMAI, T.; NOMIYAMA, H. Chemokines in immunity. **Advances in Immunology**, v.78, p. 57-110, 2001.

YOSHIMURA, A. et al. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. **Journal of Immunology**, v.163, n.1, p. 1-5, 1999.

ZEHNDER, M. et al. Cytokine gene expression--part of host defence in pulpitis. **Cytokine**, v.22, n.3-4, p. 84-88, May 2003.

ZIJP, J.R.; BOSCH, J.J.; GROENHUIS, R.A.J. HeNe-laser light scattering by human dental enamel. **Journal of Dental Research**, v.74, n.12, p. 1891-1898, Jan. 1996.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Interferência de diferentes tipos de cerâmica na fotopolimerização de cimentos resinosos e seus efeitos nas características biológicas de células imunocompetentes

Pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 78981517.4.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.409.998

Apresentação do Projeto:

Restaurações indiretas com materiais cerâmicos livres de metal vêm sendo cada vez mais utilizadas em dentes anteriores e posteriores. Para que essas restaurações sejam unidas de forma adequada à estrutura dental e obtenham longevidade na cavidade bucal é necessária a utilização de cimentos resinosos, que são fotopolimerizados. Para análises físico-químicas, serão confeccionados discos de cerâmica que serão avaliadas quanto à transmitância de luz de LED utilizada. Para as análises biológicas, serão coletados (por uma enfermeira) 20mL de sangue de 12 doadores e discos de diferentes cimentos resinosos serão mergulhados em meio de cultura por 24 horas.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar o efeito de diferentes materiais cerâmicos na transmissão de luz para polimerização de cimentos resinosos quanto ao grau de conversão de monômeros e à biocompatibilidade em células imunocompetentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A coleta de sangue será realizada pela Enfermeira Luzia Joana Vilela (COREM-MG 148001), funcionária do Departamento de Odontologia da PUC Minas, no Laboratório de Biologia Oral deste Departamento, utilizando tubos a vácuo e material descartável. O procedimento pode causar pequeno desconforto durante a coleta e é possível que ocorra um hematoma na área, o que é

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
 Bairro: Coração Eucarístico CEP: 30.535-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3319-4517 Fax: (31)3319-4517 E-mail: cep.proppg@pucminas.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG**



Continuação do Parecer: 2.409.998

minimizado por meio de compressão com dedo no local.

Benefícios: Melhor compreensão sobre os efeitos de substâncias liberadas de cimentos resinosos incompletamente polimerizados nas células imunocompetentes da polpa dentária, quanto a viabilidade e expressão de moléculas envolvidas nos processos de combate às bactérias cariogênicas e destruição do tecido pulpar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante para a área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_679487.pdf	17/10/2017 11:54:49		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCimentosResinosos.pdf	16/10/2017 02:15:34	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	15/10/2017 21:24:45	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Acelto
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	15/10/2017 21:24:25	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
 Bairro: Coração Eucarístico CEP: 30.535-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3319-4517 Fax: (31)3319-4517 E-mail: cep.propgg@pucminas.br