

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

Sheyla Omonte Neves

**EFEITO DE MONÔMEROS RESINOSOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR
LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS ESTIMULADOS POR
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Belo Horizonte
2015

Sheyla Omonte Neves

**EFEITO DE MONÔMEROS RESINOSOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR
LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS ESTIMULADOS POR
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

N514e Neves, Sheyla Omonte
Efeito de monômeros resinosos na produção de citocinas por leucócitos mononucleares humanos estimulados por *Porphyromonas gingivalis* / Sheyla Omonte Neves. Belo Horizonte, 2015.
56 f. : il.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Resinas compostas. 3. Citocinas. 4. Leucócitos. 5. Doença periodontal. I. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Sheyla Omonte Neves

**EFEITO DE MONÔMEROS RESINOSOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR
LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS ESTIMULADOS POR
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínicas Odontológicas – Área Temática: Prótese Dentária.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva – UFU
- 2- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 18 de dezembro de 2015

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 22 de janeiro de 2016

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

*Dedico ao meu Deus, o Deus do impossível;
Aos meus pais, Beth e Renê,
pelo carinho e compreensão ao longo de toda a vida;
Ao Álvaro, pelo amor e apoio incondicionais;
Ao João Vítor e Ana Clara,
meus filhos e benção de Deus.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pacientes, pela compreensão nos meus muitos momentos de ausência e, acima de tudo, pelo apoio.

Aos queridos Sarita, Douglas, Fernando, Edson e Luísa por esse período de convívio e por compartilhar seus conhecimentos. Contem comigo. Sempre.

Aos amigos da turma de Mestrado em Clínicas Odontológicas 2013-2015 pela amizade e convívio.

Ao Dr. Paulo Eduardo de Alencar e Souza, meu orientador, pela amizade, exemplo profissional e confiança. Tem sido uma honra fazer parte da sua equipe.

Aos amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB-UFMG. Obrigada pela acolhida, pelas conversas, pela amizade.

Ao Dr. Wellington Jansen e ao Dr. Paulo Seraidarian, pelos ensinamentos e agradável convívio.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUC Minas, principalmente à Angélica e Silvania, duas pessoas sempre amáveis e dispostas na colaboração com os estudantes.

Aos doadores que gentilmente cederam amostras de sangue para que esse projeto pudesse ser realizado.

Às instituições de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro sem o qual esse projeto não poderia ser realizado.

E a todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, ficam meus sinceros agradecimentos.

"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino." (LEONARDO DA VINCI)

RESUMO

Monômeros liberados de restaurações resinosas podem induzir a resposta inflamatória. No entanto, os mecanismos moleculares associados à interação dessas substâncias com células imunocompetentes humanas ainda não estão completamente elucidados. Muitas restaurações em resina são realizadas próximo aos tecidos periodontais, os quais apresentam continuamente um infiltrado inflamatório em resposta a microbiota do biofilme dentário. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de três importantes monômeros resinosos nas características funcionais de leucócitos humanos estimulados por periodontopatógenos. Para isso, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram estimuladas pela bactéria *Porphyromonas gingivalis*. Em seguida, as células foram incubadas com concentrações sub-letais dos monômeros TEGDMA, BISGMA e UDMA. A produção de IL-1 α , IL-6, TNF- α e IL-10 foi determinada pelo teste ELISA. Após 20h de incubação, o estímulo bacteriano resultou em aumento da secreção de IL-1 α e TNF- α . Os monômeros estudados não afetaram significativamente a secreção de citocinas por leucócitos mononucleares humanos estimulados ou não pelo periodontopatógeno. Assim, nossos dados sugerem que doses sub-letais de UDMA, TEGDMA e BISGMA não interferem na resposta inflamatória através da regulação da produção das citocinas IL-1 α , IL-6, TNF- α e IL-10 pelas CMSP, mesmo na presença de estímulo por *P. gingivalis*.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Resinas compostas. *Porphyromonas gingivalis*. Citocinas. Leucócitos.

ABSTRACT

Unreacted resin monomers released from dental composites interfere in the host immune inflammatory responses. The underlying molecular mechanisms associated to the interaction between these substances and human immune cells has not been fully understood. This study focused on the evaluation of UDMA, TEGDMA and BISGMA effects on the cytokine release by human leukocytes stimulated with a periodontal pathogen. Mononuclear cells from peripheral blood (PBMC) of ten individuals were exposed to *Porphyromonas gingivalis* (Pg) for 1 hour and then incubated with sub-lethal doses of BISGMA, TEGDMA and UDMA for 19 hours. The secretion of IL-1 α , IL-6, IL-10 and TNF- α was determined by ELISA. Incubation of PBMC with Pg induced a significant up-regulation of IL-1 α and TNF- α . The addition of monomers did not significantly affect cytokine release after the 20 h total period. In conclusion, sub-lethal doses of BISGMA, TEGDMA and UDMA did not affect the PBMC-related cytokine release, even after bacterial challenge. This result suggests no significant modification to the inflammatory response and periodontal tissue protection mechanisms via regulation of IL-1 α , IL-6, IL-10 and TNF- α secretion from PBMC.

Keywords: Materials testing. Composite dental resin. *Porphyromonas gingivalis*. Cytokines. Mononuclear leukocytes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A citotoxicidade dos monômeros resinosos	19
1.2 A resposta imunoinflamatória periodontal	20
1.3 As citocinas	21
1.4 O efeito dos monômeros resinosos na produção de citocinas	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 ARTIGO	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

As resinas compostas são constituídas de carga inorgânica, agente silano de união e matriz orgânica, essa última em geral composta de monômeros de metacrilatos, como o bis-fenol Glicidil Dimetacrilato (BISGMA), o Tri-etileno Glicol Dimetacrilato (TEGDMA) e o Uretano Dimetacrilato (UDMA) (SCHNEIDER; CAVALCANTE; SILIKAS, 2010). O BISGMA é um monômero base, hidrofóbico e predominante na maioria dos compósitos (BAKOPOULOU; PAPADOPOULOS; GAREFIS, 2009; SCHNEIDER; CAVALCANTE; SILIKAS, 2010). Apresenta baixa contração de polimerização e superior qualidade mecânica, quando comparado a outros monômeros. No entanto, possui alta viscosidade e baixo grau de conversão (SCHNEIDER; CAVALCANTE; SILIKAS, 2010). O UDMA também é um monômero hidrofóbico frequentemente usado em substituição ou em acréscimo ao BISGMA. É um éster uretano de cadeia alifática que promove elasticidade e possibilita a incorporação de maior quantidade de partículas inorgânicas ao corpo da resina composta. O UDMA é menos viscoso do que os monômeros aromáticos, como o BISGMA. Além disso, sua adição à matriz resinosa gera um material com melhor tensão flexural e resistência à tração (BARSZCZEWSKA-RYBAREK, 2009). Por outro lado, um polímero da cadeia uretana absorve mais água do que os compostos aromáticos, sendo, portanto mais suscetível à degradação hidrolítica e liberação no meio aquoso bucal do que o BISGMA (FERRACANE, 2006). O TEGDMA é um monômero diluente e hidrofílico. É capaz de reduzir a viscosidade da matriz resinosa e aumentar o grau de conversão do composto, além de permitir a inclusão de maior quantidade de partículas inorgânicas ao corpo da resina composta (GEURTSSEN; LEYHAUSEN, 2001). O percentual de cada um dos monômeros varia de acordo com a desejada viscosidade e dureza do produto final, ou seja, da resina composta (SCHNEIDER; CAVALCANTE; SILIKAS, 2010).

Van Landuyt et al. (2011), em uma recente revisão sistemática da literatura, afirmaram que materiais odontológicos resinosos não são inertes no meio bucal, podendo liberar componentes reativos, inicialmente devido à polimerização incompleta e depois devido à degradação. Estudos apontam para a conversão de 30-40% do composto resinoso após 5 min do procedimento de polimerização, atingindo no máximo 70-80% após 24 h (HALVORSON; ERICKSON; DAVIDSON, 2002; NEVES et al., 2005). De fato, alguns autores observaram que monômeros

residuais de metacrilato podem ser liberados das restaurações recém-polimerizadas e induzir alterações nos tecidos periodontais de animais (NASJLETL; CASTELLI; CAFFESSE, 1983). Portanto, é importante saber quanto dessa substância é liberada em boca e por quanto tempo. No entanto, devido à deficiência de estudos analíticos padronizados e aos diferentes resultados encontrados, ainda não está clara a quantidade desse material à qual o paciente pode estar exposto após confecção de restauração resinosa (VAN LANDUYT et al., 2011). Em primeiro lugar, para determinar a quantidade absoluta de monômeros liberados, é necessário se estimar a superfície de contato com o meio bucal. Quanto maior a superfície da restauração, maior quantidade de monômeros poderá ser liberada. Além disso, quanto menor o tempo de fotopolimerização empregado, maior a quantidade de monômeros residuais e, conseqüentemente, mais monômeros estarão livres para liberação no meio bucal. Outro parâmetro é a solução na qual o material resinoso foi imerso em estudos laboratoriais. A quantidade e o tipo de solução influenciam o resultado, sendo maior a liberação de monômeros nos solventes orgânicos, quando comparados às soluções aquosas (VAN LANDUYT et al., 2011). Não obstante, estudos *in vitro* sugerem que a liberação de monômeros residuais associada à polimerização incompleta da matriz resinosa ocorre em especial nas primeiras 24 horas (FERRACANE; CONDON, 1990; VAN LANDUYT et al., 2011). Por outro lado, Polydorou et al. (2007), em um ensaio experimental de longo prazo *in vitro*, demonstraram que BISGMA pode ser liberado por até 1 ano após a polimerização, fato não observado para os monômeros TEGDMA e UDMA. Portanto, BISGMA parece ser liberado de forma não-linear. Entre os monômeros avaliados no presente estudo, TEGDMA parece ser liberado em maior quantidade das resinas compostas, seguido pelo UDMA e, por fim, pelo BISGMA (VAN LANDUYT et al., 2011).

Já foi descrita na literatura a associação entre a liberação de subprodutos da resina composta no meio bucal e reações biológicas adversas, como reações pulpares, alergia e alteração estrogênica (SCHEDLE et al., 2007; BAKOPOULOU; PAPADOPOULOS; GAREFIS, 2009). Diante dessa realidade, vários estudos tem procurado identificar e descrever de que forma, e em qual intensidade, os produtos da degradação da matriz resinosa, assim como da polimerização parcial do metacrilato, podem afetar os mecanismos de defesa humanos (NODA et al., 2003; ECKHARDT et al., 2009; RAKICH et al., 1999; KRIFKA et al., 2010; BOLLING et al., 2013). Para esse fim, tem-se utilizado diversos métodos laboratoriais, entre eles a

quantificação da resposta imunológica e a avaliação da alteração da atividade e viabilidade celular.

No presente estudo, a avaliação da citotoxicidade e da interação dos monômeros e células imunocompetentes estimuladas por produtos de bactérias periodontopatogênicas foi conduzida. O objetivo foi conhecer possíveis efeitos dos monômeros em células presentes no microambiente periodontal. A hipótese geral foi que os monômeros resinosos poderiam afetar a produção de citocinas, moléculas relacionadas à resposta inflamatória, por células imunocompetentes estimuladas (ou não) por produtos da microbiota periodontal.

1.1 A citotoxicidade dos monômeros resinosos

TC₅₀ é a concentração da droga testada que permite 50% de viabilidade celular. A determinação da citotoxicidade e dos valores de TC₅₀ são importantes para guiar a seleção de doses não-letais a serem utilizadas nos estudos de expressão de citocinas. Kostoryz et al. (2001) investigaram a citotoxicidade de metacrilatos de UVR6105 (3,4-epoxycyclohexyl methyl-3,4-epoxycyclohexylcarboxylate), BISGMA e MMA (ácido metacrílico) em células endoteliais. A cultura de células foi incubada com 7 diferentes diluições de BISGMA ou MMA ou UVR6105 por 20 horas, em temperatura de 37°C e em 5% de CO₂. Após esse período de incubação, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT (KOSTORYZ; TONGA; CHAPPELOW, 1999). A TC₅₀ foi extrapolada da curva dose de monômero versus resposta celular, estabelecida no estudo e os valores encontrados para o BisGMA, MMA e UVR6105 foram, respectivamente, de 31±2µM, 11300±1750µM e 733±151µM. Em monócitos THP-1, a TC₅₀ encontrada para o BISGMA foi 80 µM (RAKICH et al., 1999). Testes de viabilidade celular para TEGDMA, realizados em monócitos THP-1 e células pulmonares humanas apresentaram TC₅₀ de 1500 µM e 1830 µM, respectivamente (NODA et al., 2003; EMMLER et al., 2008). Já o UDMA apresentou valores de TC₅₀ de 106 µM para fibroblastos gengivais humanos (REICHL et al., 2006) e 55 µM para monócitos THP-1 (RAKICH et al., 1999). Encontramos apenas um trabalho que analisou a resposta de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) aos monômeros resinosos (HEIL et al., 2002). Após 24 horas de exposição, observou-se que a TC₅₀ para BISGMA foi de 1000 µM e para TEGDMA > 10.000 µM. Nesse mesmo estudo

também foram avaliadas células THP-1. Os valores de TC_{50} para BISGMA e TEGDMA nessas células foram 80 μM e 3100 μM , respectivamente (HEIL et al., 2002).

1.2 A resposta imunoinflamatória periodontal

A resposta imunológica é a defesa do corpo contra microrganismos ou substâncias estranhas. A sua principal função é a discriminação do próprio e não próprio (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Após a injúria, ocorrem mudanças no calibre e no fluxo de pequenos vasos sanguíneos, se iniciando o processo imunoinflamatório. Há aumento da permeabilidade vascular mediado pela ação de substâncias vasoativas, como histamina, serotonina e bradicinina. A consequente separação das células endoteliais da microcirculação permite que os leucócitos extravasem para o líquido intersticial do tecido contaminado através da diapedese. Uma vez no tecido, se inicia o processo de fagocitose do agente patógeno. A fagocitose, evento mediado por interações celulares, é chave para a ativação da resposta imune adaptativa (CALICH; VAZ, 2009). Durante a evolução do processo imunoinflamatório se encontra o delicado equilíbrio entre a saúde e a doença, em que tanto a deficiência quanto o exagero resultam em dano tecidual.

Resumidamente, o sistema imune é composto de duas subdivisões principais: o sistema imune inato ou não específico e o sistema imune adaptativo ou específico (ABBAS; LICHTMAN, 2007). O sistema inato é nossa primeira linha de defesa contra a agressão patogênica. O sistema imune adaptativo age como uma segunda linha de defesa e resguarda o hospedeiro em caso de nova exposição ao microrganismo. A imunidade inata caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio. Seus mecanismos compreendem barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis (CRUVINEL et al., 2010). Na inflamação aguda, predominam elementos da resposta imune inata, sendo as principais células os monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células *natural killer*. Na inflamação crônica predominam células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos) (CRUVINEL et al., 2010).

As respostas imunológicas inata e adaptativa coexistem durante o processo de evolução da doença periodontal. A resposta inata é, em geral, mais importante

nas fases iniciais do processo patológico, uma vez que células como linfócitos precisam de tempo para que ocorra ativação, proliferação e maturação. Já a resposta imune adaptativa é essencial após a cronificação da doença, ocasionada pela permanência do periodontopatógeno no sítio afetado. Nesse cenário, coabitam moléculas solúveis e componentes celulares do sistema imune que são capazes de estimular e inibir, por exemplo, a reabsorção óssea. Dessa forma, ocorrem simultaneamente destruição e reparo teciduais, e o desequilíbrio pode levar à perda estrutural. Portanto, pode-se sugerir que as manifestações clínicas da periodontite resultam principalmente da resposta inflamatória crônica (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013), e que na doença periodontal a inflamação é responsável pela proteção, mas também por grande parte do dano causado ao periodonto.

A doença periodontal é uma infecção multifatorial associada à presença de um complexo microbiano agregado na forma de biofilme (SMALLEY et al., 2002). No entanto, há bactérias consideradas chave para a instalação da doença. *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria anaeróbia gram-negativa constituinte do denominado complexo vermelho microbiano do biofilme subgingival, sendo agente etiológico fundamental na patogênese da periodontite (MYSAK et al., 2014). É um membro natural do microbioma oral, mas pode se proliferar de forma acelerada e promover destruição periodontal (MYSAK et al., 2014). A bactéria é capaz de interagir com as células e tecidos do hospedeiro, o que estimula a produção de moléculas e mediadores, como as citocinas. Estas substâncias detêm um grande potencial para servir como indicadores de processos inflamatórios e, conseqüentemente, da doença periodontal.

1.3 As citocinas

Há meio século foi descrita a existência de pequenas proteínas, as citocinas, que são capazes de orquestrar a comunicação intercelular. Viu-se que a regulação celular ocorre através de vias de transdução de sinais entre as células, fato que torna compreensíveis os eventos em cascata característicos da resposta imunoinflamatória. As citocinas podem ser produzidas e secretadas por toda e qualquer célula nucleada humana, sempre com o objetivo de gerir a resposta imune, combatendo a infecção ou gerando dano celular (SCHMITZ et al., 2011). Portanto,

elas agem como peça essencial na comunicação celular. O delicado balanço no nível dessas moléculas é vital para a manutenção da saúde.

As citocinas modulam a função celular. Elas dependem da ligação com receptores específicos de membrana celular da célula alvo pra desempenhar a sua atividade. Em geral, há a necessidade de mais de uma citocina para que uma determinada resposta celular seja ativada, por isso elas agem em conjunto, formando uma rede complexa, na qual a secreção de uma citocina influenciará a produção ou a resposta de outras. Essas moléculas têm uma vida média curta e tem uma ação extremamente potente (TURNER et al., 2014). Elas orquestram não só a duração, mas também a intensidade da resposta inflamatória. No periodonto, por exemplo, as citocinas podem induzir a destruição tecidual através do aumento da síntese de alguns mediadores pelos próprios fibroblastos do ligamento periodontal. Dessa forma, a severidade da periodontite e da liberação de citocinas se eleva à medida que a destruição tecidual aumenta (ERTUGRUL et al., 2013).

A interleucina-1 alfa (IL-1 α) é expressa por vários tipos celulares, incluindo monócitos e macrófagos. É uma potente citocina pró-inflamatória. Estimula a diferenciação e ativação dos linfócitos T (LT) auxiliares, a ativação de linfócitos B (LB), células *Natural Killer* (NK), a proliferação de células da medula óssea e a expressão de moléculas de adesão no endotélio (TURNER et al., 2014). Além disso, é capaz de estimular a reabsorção óssea (SCHMITZ et al., 2011).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma potente citocina pró-inflamatória secretada principalmente por monócitos. Possui papel central na resposta imune inata. Induz a produção de outras citocinas e a expressão de moléculas de adesão. Essa citocina atua principalmente nos próprios macrófagos, estimulando a fagocitose (TURNER et al., 2014). Na doença periodontal, TNF- α contribui significativamente na perda óssea e inflamação tecidual (NODA et al., 2003). Essa citocina estimula a proliferação e diferenciação de células como os osteoclastos, além de combater tumores e a replicação viral (SCHMITZ et al., 2011).

A interleucina 6 (IL-6) é secretada principalmente por LT auxiliares, macrófagos e fibroblastos (TURNER et al., 2014). Sua secreção é estimulada pelas citocinas IL-1 e TNF- α (PANG et al., 1994). 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 LT e regular positivamente a síntese de proteínas

relacionadas à fase aguda da inflamação (SCHMALZ; SCHWEIKL; HILLER, 2000; ECKHARDT et al., 2009). Foi demonstrado que a IL-6 estimula a reabsorção óssea *in vitro* (MUNDY, 1991). A presença de elevada concentração de IL-6 em sítios periodontalmente comprometidos tem sido descrita na literatura científica (DONGARI-BAGTZOGLOU; EBERSOLE, 1998).

Em contraste, a interleucina 10 (IL-10) limita a magnitude da resposta imune. Essa molécula bloqueia a produção de citocinas e quimiocinas e a expressão de moléculas de superfície envolvidas na apresentação antigênica e co-estimulação de LT, como CD80, CD86 e MHC classe II. A principal função da IL-10 é inibir a síntese de TNF- α , regulando assim a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ECKHARDT et al., 2009). Desativa macrófagos e linfócitos e inibe a angiogênese. Além disso, inibe a formação de osteoclastos e a produção de prostaglandinas e radicais livres (ROMAGNANI, 2002).

1.4 O efeito dos monômeros resinosos na produção de citocinas

Há indícios de que os monômeros atuam perturbando o microambiente e, por conseguinte, alterando redes de regulação celular ao interferirem em vias de transdução de sinais e comunicação intercelular (KRIFKA et al., 2013). Já está estabelecido que a liberação de citocinas inflamatórias, assim como a expressão de antígenos na superfície celular, são eventos controlados por vias delicadas e sensíveis, que são influenciadas pelo balanço redox celular (ECKHART et al., 2009). Essas vias são, principalmente, aquelas que envolvem quinases e o fator nuclear NF- κ B, englobando, portanto, a via de sinalização MPA quinase e a via TLR (Toll Like Receptor) (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006).

Alguns autores sugerem que TEGDMA, UDMA e BISGMA tem um potencial limitado para induzir, por si mesmo, a resposta imunoinflamatória (RAKICH et al., 1999; MOHARAMZADEH et al., 2007; KRIFKA et al., 2010). Seria necessário, portanto, a estimulação patogênica para que a secreção de citocinas acontecesse e, então, houvesse atuação por parte do monômero resinoso. De fato, Schmalz, Schweikl e Hiller (2000) observaram uma pequena alteração no nível de IL-6, e nenhuma alteração no nível de prostaglandina E₂ e IL-8 em cultura de epitélio oral humano, após a exposição ao TEGDMA e sem a estimulação pelo produto bacteriano. Diferentemente, vários estudos descreveram a regulação negativa da

liberação de citocinas por macrófagos e monócitos estimulados por patógenos e incubados com TEGDMA, BISGMA e UDMA, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (RAKICH et al., 1999; NODA et al., 2003; ECKHARDT et al., 2009; KRIFKA et al., 2010; BOLLING et al., 2013).

Noda et al. (2003) incubaram monócitos humanos THP-1 com HEMA e TEGDMA, mercúrio e níquel por duas semanas. As células foram então expostas ao lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. TEGDMA em concentração de 0.25-0.80mM suprimiu em 40-70% a secreção de TNF- α pelo monócito estimulado pelo patógeno. Em outro estudo, realizado em 2009, os autores avaliaram a atuação do TEGDMA na secreção de TNF- α e também de IL-6 e IL-10. Macrófagos RAW264.7 expostos a LPS de *Escherichia coli* foram incubados com 0.125 a 2mM de TEGDMA, dessa vez por 48 horas. Observou-se a redução de 20–95% na secreção de TNF- α , IL-6 e IL-10 (ECKHARDT et al., 2009). Recentemente, Mathisen et al. (2015) investigaram a secreção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos RAW264.7 incubados com baixas doses de TEGDMA, 50 μ M, por um período de 48 horas. As células foram primeiramente expostas ao monômero por 24 horas e, então, por mais 24 horas adicionando LPS de *Escherichia coli*. Os autores observaram atenuação da secreção de IL-1 β , mas nenhuma alteração nos níveis de TNF- α . Em um estudo anterior, esse mesmo grupo de pesquisa observou a inibição de IL-1 β e TNF- α em macrófagos RAW264.7. As células foram estimuladas por LPS após incubação com TEGDMA por um período total de 48 horas. Relatou-se a redução em 50-90% nos níveis de IL-1 β quando incubadas em 50-200 μ M de TEGDMA. A inibição de TNF- α foi alcançada apenas na concentração de 200 μ M (BOLLING et al., 2013).

Kuan et al. (2012a), por sua vez, descreveram um aumento dose-dependente na secreção de TNF- α por macrófagos murinos incubados com BISGMA num período de até 2 horas. Observou-se que concentrações de BISGMA tão pequenas quanto 3 μ M já são capazes de provocar citotoxicidade e genotoxicidade nos macrófagos. Em um segundo estudo, esse mesmo grupo observou um aumento na geração de IL-1 β , IL-6, óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigênio (ROS) por macrófagos incubados com BISGMA (KUAN et al., 2012b).

Chang et al. (2014) avaliaram a toxicidade do UDMA às células pulpares humanas. O monômero provocou alterações morfológicas e perda de 29-49% da viabilidade celular nas concentrações de 0.1-0.35 mM. Toniato et al. (2012) avaliaram a liberação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α por células

incubadas com UDMA. Culturas de células humanas provenientes da polpa, ligamento periodontal, gengiva e periosteio foram incubadas com o monômero resinoso por 24 horas. Os pesquisadores observaram uma regulação positiva da produção de IL-6, IL-8 e TNF- α , sugestiva de que UDMA é capaz de induzir a secreção de mediadores da inflamação. A aplicação direta de UDMA teria, portanto, o potencial de induzir a resposta imunoinflamatória, podendo ser o ponto inicial de toxicidade e dano celular nos tipos celulares estudados no experimento.

Ressalta-se que as pesquisas *in vitro* abordadas nessa revisão de literatura utilizaram LPS de *Escherichia coli* (NODA et al., 2003; ECKHARDT et al., 2009; KRIFKA et al., 2010; BOLLING et al., 2013; MATHISEN et al., 2015). Diferentes bactérias podem apresentar variação na capacidade de estimular a produção de citocinas (BARKSBY et al., 2009). Portanto, é importante confirmar se os resultados descritos até então na literatura são reprodutíveis ao se utilizar bactérias de relevância na cavidade bucal, como *Porphyromonas gingivalis*.

Sabe-se que a presença de microrganismos no sulco gengival mantém um infiltrado inflamatório persistente no tecido gengival. A relevância do presente trabalho se baseia na hipótese de que o contato de restaurações em resina com os tecidos gengivais pode causar alterações nos processos celulares periodontais, alterando o processo inflamatório estabelecido. Assim sendo, os monômeros liberados poderiam comprometer a integridade tecidual e o combate aos produtos microbianos provenientes do sulco gengival (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013). Como mencionado anteriormente, moléculas como as citocinas são extremamente importantes no estabelecimento e manutenção de interações celulares. Portanto, a expressão diferencial dessas moléculas pode constituir um fator importante na determinação da ação biológica dos monômeros resinosos no processo imunoinflamatório periodontal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de monômeros resinosos na viabilidade celular e na produção de moléculas envolvidas com a resposta imunoinflamatória em leucócitos mononucleares humanos estimulados ou não pela bactéria *P. gingivalis*.

2.2 Objetivos específicos

- a) determinar as curvas de citotoxicidade dos monômeros resinosos BISGMA, TEGDMA e UDMA para células mononucleares de sangue periférico humano;
- b) avaliar o efeito dos mesmos monômeros, em diferentes concentrações subletais, na produção de mediadores imunoinflamatórios por leucócitos mononucleares estimulados ou não por *P. gingivalis*.

3 ARTIGO

Ao término desta pesquisa, foi possível elaborar a seguinte proposta de artigo, que será encaminhada para publicação na revista Dental Materials:

The effect of resin monomers on the cytokine response of human leukocytes stimulated with *Porphyromonas gingivalis*

Artigo preparado dentro das normas da revista Dental Materials (Qualis A1).

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

The effect of resin monomers on the cytokine response of human leukocytes stimulated with *Porphyromonas gingivalis*

Sheyla Omonte Neves^a, Luísa Mourão Dias Magalhães^b, Walderez Ornelas Dutra^{b,e}, Kenneth John Gollob^{c,e}, Tarcília Aparecida Silva^d, Martinho Campolina Rebello Horta^a, Paulo Eduardo Alencar Souza^a

^a Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

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

^c Graduate Program in Medicine and Biomedicine, Institute for Education and Research, Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^d Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author: Paulo Eduardo Alencar Souza. Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Avenida Dom José Gaspar, 500. Prédio 46. Sala 101. Coração Eucarístico. Belo Horizonte - Minas Gerais. Brasil. CEP: 30535-901.

Phone number: +55 31 3319-4414

Telefax number: +55 31 3319-4415

E-mail: pauloalencar@pucminas.br

ABSTRACT

Objectives: Unreacted resin monomers released from dental composites interfere in the host immune inflammatory responses. The underlying molecular mechanisms associated to the interaction between these substances and human immune cells has not been fully understood. This study focused on the evaluation of UDMA, TEGDMA and BISGMA effects on human leukocytes stimulated by a periodontal pathogen.

Methods: Mononuclear cells from peripheral blood (PBMC) of ten individuals were exposed to *Porphyromonas gingivalis* (Pg) for 1 hour and then incubated with sub-lethal doses of BISGMA, TEGDMA and UDMA for 19 hours. The secretion of IL-1 α , IL-6, IL-10 and TNF- α was determined by ELISA.

Results: Incubation of PBMC with Pg induced a significant up-regulation of IL-1 α and TNF- α . The addition of monomers did not significantly affect cytokine release after the 20 h total period.

Significance: Sub-lethal doses of BISGMA, TEGDMA and UDMA did not affect the PBMC-related cytokine release, even in cells challenged with bacteria. This result suggests no significant modification to the inflammatory response and periodontal tissue protection mechanisms via regulation of IL-1 α , IL-6, IL-10 and TNF- α secretion from PBMC.

Keywords: Cytokines; *Porphyromonas gingivalis*; Mononuclear leukocytes; Materials testing; Composite dental resin.

1. Introduction

The employment of resin-based materials in dentistry is presently ubiquitous. Dental composite resins comprise a complex mixture of materials that usually consist of an organic matrix, reinforcing inorganic filler and a silane-coupling agent which connects the filler and the resin matrix [1]. Currently, the most common resin systems used in dentistry are metacrylates [2,3]. In these systems, the polymerizable organic matrix contains one or more base monomers such as bisphenol A-glycidyl methacrylate (BISGMA), urethane dimethacrylate (UDMA), and diluent monomers as triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) [1].

Methacrylate monomers are key components that help achieving the required resin-based dental material characteristics. Stimulus, such as light, make monomers transform in polymers, but complete reaction is yet a challenge. Literature suggests that the best polymerization that can be achieved in freshly light-cured dental composites is around 30-40%, hiking to 50-70% after 24 h [4]. Consequently, unreacted resin monomers may leach from dental composites, particularly in the first 24 hours after placement [5,6]. Then, monomers elute for many days after polymerization, due to both incomplete curing and as a consequence of natural degradation [5]. This fact undermines biocompatibility, and there is evidence that monomers act disturbing the environment, and ultimately changing the regulation of cellular systems in various cell types [3,7-10].

In this regard, adverse biological reactions to resin components, such as local and systemic toxicity, pulp reactions, allergy, genotoxicity and cytotoxicity have been reported [3,11]. However, studies targeting PBMC-derived immune cells stimulated with periodontal pathogens, commonly found in the gingival sulcus, are scarce. In

addition, the underlying mechanism associated to the effect of resin monomers sub-lethal doses in the periodontal inflammation awaits elucidation.

Dental biofilms keep a persistent sub-clinical inflammatory infiltrate in the gum tissue. *Porphyromonas gingivalis* (Pg), a gram-negative anaerobic bacteria that colonizes sub gingival tissue sites, plays an important role in triggering periodontal inflammation [12]. The immune system recognizes pathogenic invaders such as Pg and initiates an inflammatory response. It launches the production of numerous inflammatory mediators such as pro- and anti-inflammatory cytokines [13]. These molecules are regulated by tightly controlled pathways and orchestrate the intercellular communication, coordinating the host cell response. Mononuclear leukocytes play a critical role in this process. Although the bacterial biofilm is important in the initiation and progression of periodontitis, it is primarily the host inflammatory response that promotes considerable damage to the periodontal tissues. In fact, a delicate balance between health and disease maintains tissue integrity. Any disability or excess of inflammatory response may result in tissue damage. In this scenario, the contact of a composite resin restoration with gingival tissues, and the local release of monomers, may cause changes in periodontal cellular processes, acting as a local stressor.

In the present study, we focused on evaluating the effect of monomers on leukocytes stimulated or not by Pg. The goal was to better understand the possible periodontal hazards due to the use of resin composites in the oral cavity. Both bacteria and monomers may imply environmental stress to periodontal tissue, thus influencing the target cell reactions in a combined way. To the best of our knowledge, the present study is the first to report on the effect of monomers exposure in cytokine production by leukocytes stimulated with a periodontal pathogen. Our results

demonstrated that sub-lethal doses of monomers decrease cell viability, but do not influence cytokine release.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Three monomers were chosen because they are constituents of a variety of dental resin systems. Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate (BISGMA), triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) and urethane dimethacrylate (UDMA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). These monomers were dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The resin monomers stock solutions were diluted down to obtain an up to 0.9% (v/v) final concentration of DMSO in cell cultures.

2.2 Cell metabolic activity studies

The study protocol was approved by the Ethics and Research Committee of The Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

Blood samples (10 mL) were drawn by peripheral venipuncture into heparinized vacutainer tubes (Becton and Dickinson, Vacutainer®, New Jersey, USA). Purification of mononuclear cells was performed as we described previously [14]. Briefly, heparinized blood was diluted to a proportion of 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were isolated from peripheral blood by density gradient centrifugation in Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). The PBMC interface was collected and washed three times by centrifugation with

phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in Rosewell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with antibiotic-antimycotic (0.25 g/mL amphotericin B, 200 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin [Sigma, St. Louis, MO]) and L-glutamine (1 mM [Sigma, St. Louis, MO]), complete RPMI, to a concentration of 1.4×10^6 cells/mL. PBMC seeded in 96-well plate (2.5×10^5 cells/well) were incubated with serially diluted concentrations (2-fold dilutions) of BISGMA (1000 to 7.8 μ M), TEGDMA (10.000 to 78 μ M) and UDMA (2000 to 15 μ M) for 20 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were then subjected to a colorimetric functional assay (MTT) for assessing mitochondrial activity. Experiments were performed in triplicate. Positive control groups were cells in complete RPMI with 0.9% DMSO and cells without DMSO. Negative control were cells heated at 100°C for 15 min. The plates were centrifuged (1200 rpm, 22°C, 10 min). The culture medium was removed from each well, and the cells resuspended in 110 μ L of methyl tetrazolium (MTT, 2.5 mg/mL in RPMI-1640 solution 10% v/v) and incubated for 4 h at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂. The viable cells metabolized the yellow MTT and generated the purple formazan product, which was dissolved in 100 μ L of DMSO and read against blank reagent at 575 nm using a micro plate reader (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The concentration of each monomer that caused a 50% (TC₅₀) and 20% (TC₂₀) decrease in the cell metabolic activity was interpolated from the dose-response curves. This was carried out by fitting the experimental data to a sigmodal curve using the least mean square algorithm.

2.3 Bacterial preparation

A single strain of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 was purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured as previously described by Kinane et al. [15]. *P. gingivalis* (Pg) were reactivated and cultured in Brucella agar (Pronadisa, Madrid, Spain) containing 5% blood, 5% yeast extract and 0.1% of hemin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 0.1% menadione (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) under anaerobic conditions (Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA) with an atmosphere of 90% N₂, 10% CO₂, at 37°C for 48 h. The purified bacterial colonies were then harvested in PBS and heat inactivated at 100°C for 30 min., as described by JIA et al. [16]. The final concentration of the *P. gingivalis* suspension was 4×10^{11} CFU (colony forming units) per mL. The stock solution was kept in -20°C freezer, thawed and diluted prior to experiments. The appropriate dilutions were made to achieve the desired concentration (moi:100).

2.4 Incubation of PBMC with *Porphyromonas gingivalis* and resin monomers

To analyze the production of cytokines, blood samples (10mL) from ten healthy individuals (7 females, 3 males) were drawn by peripheral venipuncture into heparinized vacutainer tubes. All subjects did not use drugs that interfere with the immune inflammatory response. Purification of PBMC was performed as aforementioned in the cell viability studies section. After that, cells were resuspended in complete RPMI (RPMI supplemented with antibiotic-antimycotic and L-glutamine) to a concentration of 1.0×10^6 cells/mL. The cells were then subjected to eight conditions: 1) Control (media), 2) BISGMA, 3) TEGDMA, 4) UDMA, 5) Pg (*P. gingivalis*), 6) Pg + BISGMA, 7) Pg + TEGDMA, 8) Pg + UDMA. In the Control group

the PBMC were maintained in culture media. In the groups stimulated with Pg, cells were challenged with heat-inactivated *P. gingivalis* at moi:100 (1.0×10^8 CFU/mL). All samples were cultured for 1 h, at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂. The resin monomers were then added to the test group samples to a final concentration of their TC₂₀. Cells were incubated for additional 19 h at 37°C, 5% CO₂, making a total incubation time of 20 h. All samples were centrifuged (3000 rpm, 4°C, 6 min) and the supernatant collected to be analyzed. The production of IL-1α, IL-6, TNF-α and IL-10 was determined by double-ligand enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's protocol (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). The results were expressed as picograms of cytokine/mL.

To confirm the non-lethal TC₂₀ values in all eight conditions tested in the ELISA assay, a trypan blue exclusion test was performed as a separated experiment. After the 20 h incubation, a total of 10 µl of the cell suspension from five individuals and 30 µl of trypan blue reagent (T6146, Sigma, USA) were mixed and incubated at room temperature for 5 min. The dye trypan blue did not infiltrate intact cell membrane, thus viable cells were colorless/clear and non-viable cells showed a blue color. Cells were then counted using a Neubauer hemocytometer under a light microscope (Olympus IX71) and the viable/clear cells were divided by the number of total cells.

2.5 Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test showed that data were not from a normally distributed population. Thereafter, we applied the Friedman test followed by post hoc Dunn test to assess the existence of differences among the various groups. The level of

significance was set at 5%. These analyses were performed using the GraphPad Prism 5:01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software.

3. Results

3.1 Effect of resin monomers on PBMC metabolic (mitochondrial) activity

The MTT assay revealed that all substances tested exhibited a dose-dependent cytotoxicity to PBMC (Fig. 1). Both positive control groups with and without DMSO showed similar cell mitochondrial activity results ($p > 0.05$). As expected the negative control cells (heated cells) presented low absorbance (0-7%). In high concentrations, the monomers exhibited toxic effects on PBMC and inhibited the cell metabolization of MTT. UDMA at concentrations of 0.05 - 2 mM decreased the mitochondrial activity of PBMC by 50-93% (Fig. 1A). TEGDMA at concentrations of 2.5 - 10 mM diminished cell activity by 26-93% (Fig. 1B), whereas BISGMA at 0.06 - 1 mM caused a 44 - 95% decrease (Fig. 1C). Therefore the following order of toxicity (TC_{50} values) was observed (μM): BISGMA 69.0 (62.1-77.3, 98% confidence interval), UDMA 505.0 (429.1-593.9, 95% confidence interval) and TEGDMA 3161.0 (2697.0-3708.0, 90% confidence interval), and the TC_{20} values were 50.5 μM , 167.0 μM and 2150.0 μM for BISGMA, UDMA and TEGDMA, respectively. The TC_{20} values were used in the following experiments.

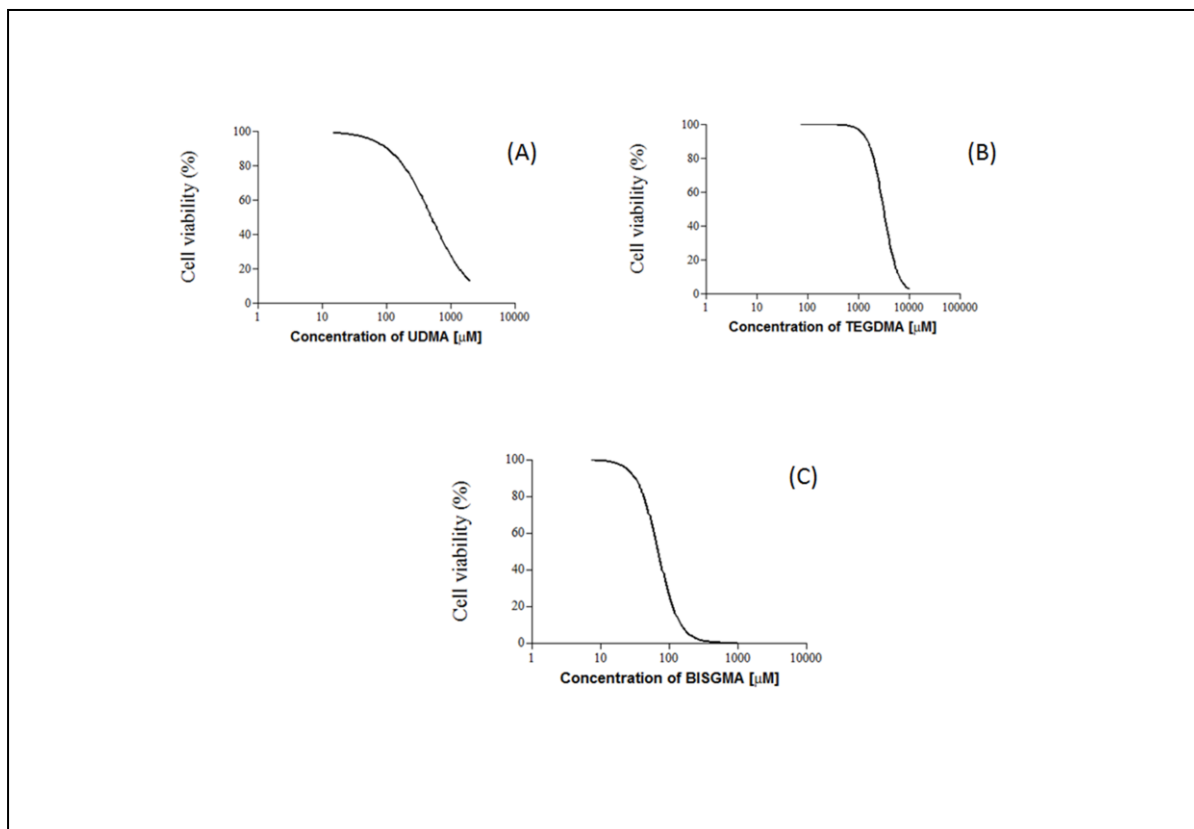


Fig. 1 - Dose-response curves for PBMC treated with monomers after 20 hours of exposure. Cell viabilities were assessed by a MTT-based assay and expressed as a percentage of control (media). The curves correspond to a sigmoidal fitting.

As MTT measures metabolic activity, not necessarily viability, an experiment that directly measures cell death is warranted to confirm a MTT-based cell viability assay. Therefore, the impact on cell survival was confirmed by the trypan blue method, which showed that the TC_{20} of BISGMA, TEGDMA and UDMA with or without Pg decreased in 20-30% the number of viable cells, as compared to the controls (media and Pg) (Fig. 2). The number of nonviable cells was very low, but the total number of cells in the test groups significantly decreased, as compared to the controls media or Pg.

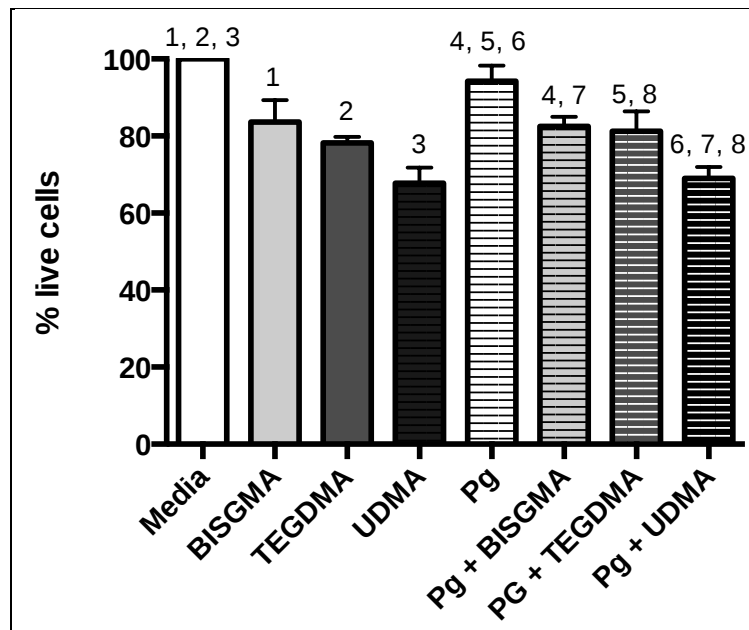


Fig. 2 - The effect of Pg and resin monomers on cellular viability in PBMC, assessed by the trypan blue exclusion assay. The x-axis corresponds to the different cell culture treatments. Cellular viability is expressed as a percentage of control (media). Graph bars represent the mean values $\pm$ standard deviation. Numbers shared in common between the groups indicate significant differences (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

3.2 Effect of *P. gingivalis* and resin monomers in cytokine release

In our experiments, PBMC were exposed to heat-inactivated Pg or left undisturbed for 1 hour, and then incubated with TC₂₀ BISGMA, TEGDMA or UDMA. After 20 hours, the resin monomers did not affect cytokine production, as compared to the incubation with media alone (Control group) (Fig. 3). Pg led to a significant increase in the production of pro-inflammatory cytokines IL-1 α and TNF- α by PBMC, as compared to the Control group (Fig. 3).

Secretion of IL-1 α , TNF- α and IL-6 was not altered in cells exposed to Pg and resin monomers, as compared to Pg stimulation alone (Fig. 3). Interestingly, the analysis showed that TEGDMA and UDMA treatment rendered no effect on the pro-inflammatory IL-1 α and TNF- α cytokine production by cells challenged with Pg, as compared to the Control group (media) (Fig. 3). At the same time, incubation with

BISGMA and Pg significantly increased these cytokines release, as compared to the untreated control culture (Fig. 3). Although Pg challenge led to a significant increase on IL-1 α and TNF- α secretion by cells incubated with BISGMA, this effect was not observed in TEGDMA and UDMA (Fig. 3).

In all groups, the absence of Pg provided no detectable quantities of IL-10 after 20 h (data not shown). Pg triggered IL-10 secretion only in 3 out of 10 individuals, producing no statistical significant difference, as compared to control. Pg and BISGMA incubation stimulated IL-10 production in 2 individuals, whereas no individual presented IL-10 release after UDMA and TEGDMA addition. Differently, IL-6 was detected in the medium supernatants in all groups (Fig. 3). The statistical analysis showed no differences among groups. Thus, the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and pro-inflammatory IL-6 were not influenced neither by the treatment with Pg nor by the monomers incubation.

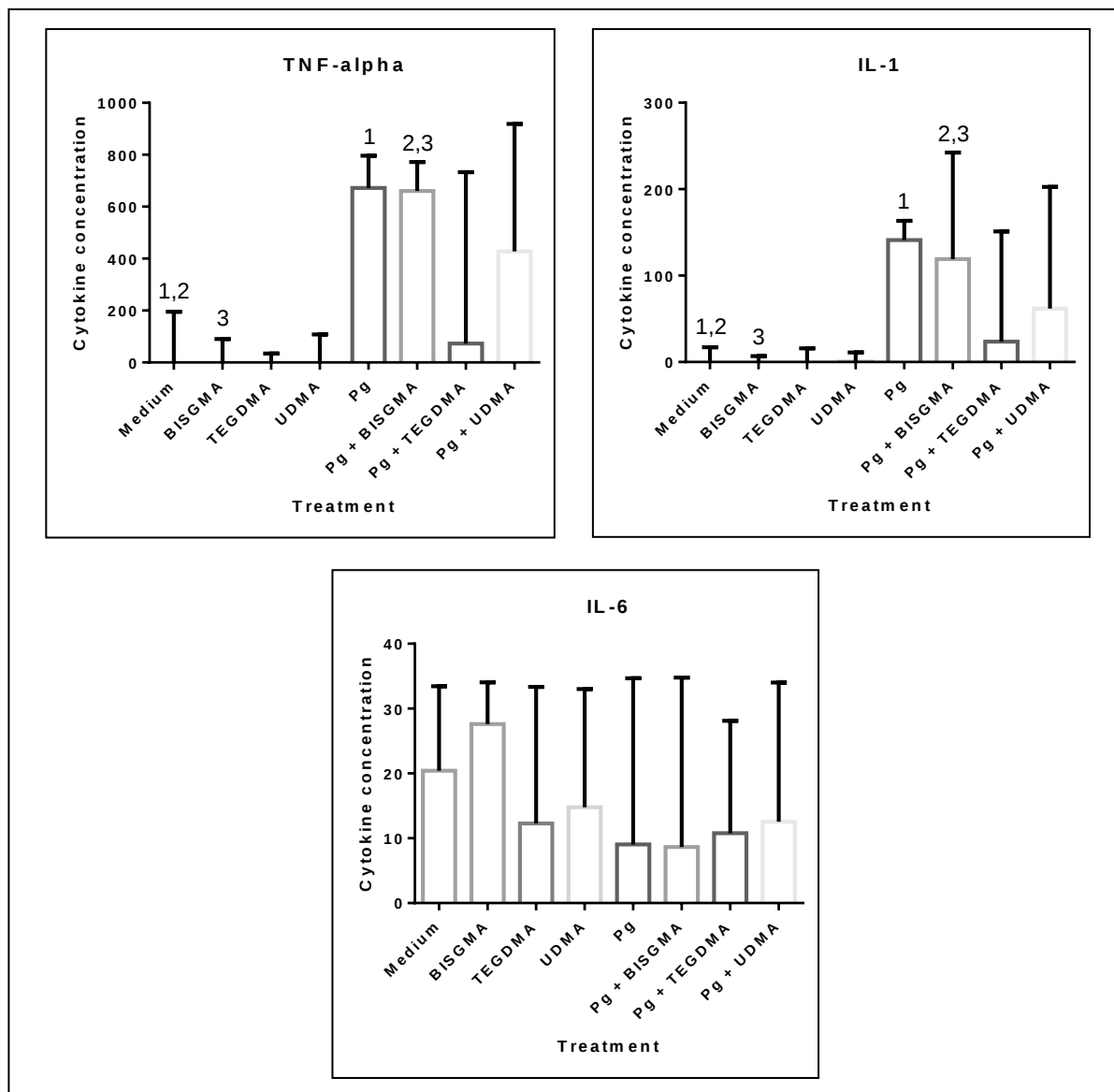


Fig. 3 - Cytokine release by PBMC either challenged or not with *P. gingivalis*, in the presence or absence of resin monomers at TC₂₀ concentrations. Culture supernatants were harvested and tested for the secretion of cytokines using ELISA analysis. Graph bars represent mean values $\pm$ standard deviation. The values on the y-axis correspond to the concentrations of TNF- α (pg/mL), IL-1 (pg/mL) and IL-6 (ng/mL). Numbers shared in common between the groups indicate significant differences (Friedman test followed by post hoc Dunn test, $p < 0.05$).

4. Discussion

Although resin monomers may leach from resinous materials [6] and interact with immune cells, scarce data regarding the influence of these chemicals on functional characteristics of human PBMC-derived immune cells, i.e., mononuclear

leukocytes is available. The present study investigated the molecular mechanisms underlying the effect of sub-lethal doses of BISGMA, TEGDMA and UDMA on cells challenged with pathogens. To better simulate *in vitro* the periodontal microenvironment, immune cells present in the periodontal tissues, mononuclear leukocytes, and an important periodontal pathogen (*P. gingivalis*) were used, and the secretion of cytokines related to periodontal health and disease was analyzed. IL-1 α , TNF- α and IL-6 are pro-inflammatory cytokines that enhance bone resorption and activate lymphocytes [17], whereas IL-10 displays anti-inflammatory properties and inhibits bone resorption [18].

The assessment of cells ability to reduce the tetrazolium dye, MTT, revealed a high dose-dependent cytotoxicity for BISGMA, UDMA and TEGDMA. This result is similar to previous studies that observed important cytotoxic effects associated to diverse cell lines incubated with resin monomers [19-23]. It is worth noting that some studies proved that the susceptibility and the determination of the TC₅₀ to a monomer depend on the type of host cells [21,24]. The PBMC TC₅₀ to TEGDMA was 3750 μ M. Using primary human gingival fibroblast cells the TEGDMA TC₅₀ value was 3460 μ M [20]. In contrast, human THP-1 monocytes and human pulmonary cells displayed TC₅₀ of 1500 μ M and 1830 μ M, respectively [22,25]. Furthermore, the PBMC TC₅₀ to BISGMA was 69 μ M, whereas Kostoryz et al. [26] found a 31 μ M for immortal human endothelial cells, and Engelmann et al. [27] 100 μ M for primary human oral fibroblasts. UDMA presented a TC₅₀ value of 505 μ M in the present study, while a 55 μ M for human THP-1 monocytes [7] and 106 μ M for primary human gingival fibroblasts [20] were previously described. Therefore, our results confirmed that cytotoxicity vary considerably depending on the applied cell culture and resin monomer.

TC₅₀ values are commonly determined by cell metabolic activity studies. The TEGDMA TC₅₀ was considerably higher than that observed for UDMA, and BISGMA presented the lowest value. This result is corroborated by other studies that observed a cytotoxicity ranking as follows: BISGMA > UDMA > TEGDMA [20,21,24].

Our results suggest that TC₂₀ BISGMA, TEGDMA and UDMA did not affect the pro-inflammatory IL-1 α , IL-6, TNF- α and anti-inflammatory IL-10 secretion by unstimulated human mononuclear leukocytes, after a 20 h incubation. These findings are similar to data referring to cells such as fibroblasts and THP-1 macrophages. No effect on cytokine release from unstimulated cells was observed after a 24 and 72 h incubation with various concentrations of the three chemicals studied here [7,8,28]. Thus, resin monomers seem to not influence cytokine secretion by themselves after 20-24 h of incubation. In contrast to this, Kuan et al. [10] found increased TNF- α secretion by mouse macrophages exposed for 2 h to BISGMA, in the absence of pathogens.

After co-stimulation with bacteria, TEGDMA and UDMA slightly down regulated the release of IL-1 α and TNF- α . These results were not significantly different from Pg-stimulated cells, but statistically identical to control (media). Thus, these two monomers may interfere with IL-1 and TNF- α metabolism in cells previously activated by a pathogen, as observed by others [7]. Nonetheless, as patient-specific variables may blur studies using primary cells, our result only shows a tendency, not a statistically proven fact.

It is worth noting that untreated PBMC released IL-6, and Pg did not interfere with this cytokine secretion. The cytokine kinetics may explain the maintenance of IL-6 levels observed here. Some authors [29] demonstrated that endotoxins stimuli induces a time-dependent IL-6 production. Therefore, further studies testing Pg

stimulation on PBMC at different time points are needed. Nevertheless, the monomers tested in this study did not affect the IL-6 basal metabolism, with or without pathogen challenge. Thus, we demonstrated that sub-lethal doses of these monomers do not significantly affect the release of this cytokine, an important molecule in the periodontal microenvironment, related to inflammatory response and bone loss [17]. Incubation of PBMC with the chemicals and the pathogen rendered no effect on cell production of IL-10, whereas IL-1 α and TNF- α were clearly affected. As different cytokines present diverse secretion kinetics, further experiments testing resin monomers at various incubation times are necessary to analyze their effect on the release of IL-10, a potent anti-inflammatory cytokine that inhibits osteoclastic bone resorption and regulates osteoblastic bone formation [18].

Eckhardt et al. [8] found significant changes in cytokine production by mouse macrophages treated with increasing TEGDMA concentration for over 48 h and challenged with lipopolysaccharides. They detected a clear concentration-dependent inhibition of IL-10, IL-6 and TNF- α release. In addition, another study suggested that low concentrations of TEGDMA reduced the LPS-induced cytokine release by mouse macrophages [9]. First, both studies used mouse cells, whereas we analyzed human PBMC. As mentioned earlier, different cell lines may react differently to the same substance. Furthermore, we tested monomers exclusively in their TC₂₀ concentration, a non-lethal dose. Higher monomer concentrations may alter PBMC-related cytokine release. That is to say, resin monomer concentrations that diminish the number of viable cells will probably down-regulate the total cytokine secretion. If the number of cells capable of responding to stimuli is reduced, a decrease on cytokine levels in culture is expected, a bias that may compromise the analysis of the resultant cytokine levels detected in the medium supernatants.

In this *in vitro* study, the experimental conditions were limited to one microbial agent and one time point. Furthermore, oral environment factors, such as saliva, may impact the cytotoxicity and cell response to the substances studied here. Nevertheless, the present study was performed in controlled experimental conditions and rendered reliable and reproducible results. Further research is necessary to investigate the clinical relevance of our findings.

5. Conclusion

The effect of BISGMA, TEGDMA and UDMA on human leukocytes stimulated with a periodontal pathogen, demonstrated for the first time in this research, indicates that sub-lethal doses of these chemicals might not influence IL-10, IL-6, IL-1 α and TNF- α production. Our results suggest no significant modification to the inflammatory response and periodontal tissue protection mechanisms via regulation of IL-1 α , IL-6, IL-10 and TNF- α secretion from PBMC.

Acknowledgements – We sincerely thank Dr. Álvaro Neves and Dr. Álvaro Vianna (Department of Physics, Federal University of Viçosa, Brazil) for their kind technical guidance. The authors are also grateful to the volunteers for their participation in the study. This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. WOD, KJG and TAS are CNPq fellows. SVO and LMDM are Capes fellows.

Conflicts of interest – The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Schneider LF, Cavalcante LM, Silikas N. Shrinkage stresses generated during resin-composite applications: a review. *J Dent Biomech* 2010;1:131630.
- [2] Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997;105:97-116.
- [3] Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci* 2009;10:3861-99.
- [4] Halvorson RH, Erickson RL, Davidson CL. Energy dependent polymerization of resin-based composite. *Dent Mater* 2002;18:463-9.
- [5] Polydorou O, König A, Hellwig E, Kümmerer K. Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur J Oral Sci* 2009;117:68-75.
- [6] Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, et al. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater* 2011;27:723-47.
- [7] Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect on dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod* 1999;25(2):114.
- [8] Eckhardt A, Gerstmayr N, Hiller KA, Bolay C, Waha C, Spagnuolo G, et al. TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomater* 2009;30:2006-14.
- [9] Bølling AK, Samuelsen JT, Morisbak E, Ansteinsson V, Becher R, Dahl EJ, et al. Dental monomers inhibit LPS - induced cytokine release from the macrophage cell line RAW264.7. *Toxicol Letters* 2013;216:130-8.

- [10] Kuan YH, Li YC, Huang FM, Chang YC. The upregulation of tumour necrosis factor- α and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate. *Int Endod J* 2012;45:619-26.
- [11] Schedle A, Ortengren U, Eidler N, Gabauer M, Hensten A. Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated? *Clin Oral Implants Res* 2007;18:232-56.
- [12] Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res* 2014;2014:476068.
- [13] Schmitz ML, Weber A, Roxlau T, Gaestel M, Kracht M. Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:2165-75.
- [14] Souza PEA, Gomez RS, Xavier GM, Santos JSC, Gollob KJ, Dutra WO. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. *J Oral Pathol Med* 2005;34(5):312-17.
- [15] Kinane JA, Benakanakere MR, Zhao J, Hosur KB, Kinane DF. *Porphyromonas gingivalis* influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. *Cell Microbiol* 2012;14:1085-96.
- [16] Jia R, Kurita-Ochiai T, Oguchi S, Yamamoto M. Periodontal Pathogen Accelerates Lipid Peroxidation and Atherosclerosis. *J Dent Res* 2013;92:247-52.
- [17] Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:248-66.

- [18] Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, et al. Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. *BioMed Res Int* 2014;2014:284836.
- [19] Harorli OT, Bayindir YZ, Altunkaynak Z, Tatar A. Cytotoxic effects of TEGDMA on THP-1 cells in vitro. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14:e489-93.
- [20] Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, et al. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 2006;80:370-7.
- [21] Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and tree human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998;41(3):474-80
- [22] Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H. Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF-alpha secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater* 2003;19:101-5.
- [23] Chang HH, Chang MC, Wang HH, Huang GF, Lee YL, Wang YL, et al. Urethane dimethacrylate induces cytotoxicity and regulates cyclooxygenase-2, hemeoxygenase and carboxylesterase expression in human dental pulp cells. *Acta Biomater* 2014;10:722-31.
- [24] Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT Keratinocytes. *Dent Mater* 2007;23:40-4.
- [25] 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;24:1670-75.

- [26] Kostoriz EL, Tong PY, Strautman AF, Glaros AG, Eick JD, Yourtee DM. Effects of dental resins on TNF-alpha-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *J Dent Res* 2001;80:1789-92.
- [27] Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, Neuhoﬀ NV, Schlegelberger B, et al. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts *in vitro*. *Biomater* 2004;25:4573-80.
- [28] Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater* 2007;23:40-4.
- [29] De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 1992;4:239-48.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As resinas compostas são constituídas de carga inorgânica, um agente silano de união, e matriz orgânica, em geral composta de monômeros de metacrilatos. Pouco se sabe sobre a atuação desses monômeros resinosos na atividade de células imunocompetentes estimuladas por produtos de periodontopatógenos. O presente trabalho demonstrou que doses sub-letais de BISGMA, TEGDMA e UDMA produzem toxicidade dose-dependente em leucócitos humanos mononucleares. Por outro lado, nas condições experimentais testadas nesse estudo, em doses subletais, os monômeros avaliados não afetaram a secreção de citocinas, independentemente de estimulação bacteriana.

Por fim, os resultados dessa pesquisa permitem concluir que:

- a) a grau de citotoxicidade dos monômeros resinosos aos leucócitos mononucleares humanos pode ser ordenado da seguinte forma: BISGMA>UDMA>TEGDMA;
- b) a TC₅₀ para o BISGMA, UDMA e TEGDMA foi 69 µM, 505 µM e 3161 µM, respectivamente;
- c) após 20h, a incubação com os monômeros avaliados, na concentração TC₂₀, não estimulou a produção de IL-1α, TNF-α, IL-10 e IL-6 pelos leucócitos mononucleares humanos;
- d) após 20h, a incubação com a bactéria *Porphyromonas gingivalis* estimulou a produção das citocinas IL-1α e TNF-α pelos leucócitos mononucleares humanos, mas não alterou a secreção de IL-10 e IL-6;
- e) após 20h, a incubação dos monômeros avaliados, na concentração TC₂₀, não provocou alteração estatisticamente significativa na produção de IL-1α, TNF-α, IL-10 e IL-6 pelos leucócitos mononucleares humanos estimulados pela bactéria *Porphyromonas gingivalis*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 354p.
- BAKOPOULOU, A.; PAPADOPOULOS, T.; GAREFIS, P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.9, p. 3861-3899, Sept. 2009.
- BARKSBY, H.E. et al. Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Clinical & Experimental Immunology**, v.156, n.3, p. 479-487, June 2009.
- BARSZCZEWSKA-RYBAREK, I.M. Structure-property relationships in dimethacrylate networks based on Bis-GMA, UDMA and TEGDMA. **Dental Materials**, v.25, n.9, p. 1082-1089, Sept. 2009.
- BOLLING, A.K. et al. Dental monomers inhibit LPS-induced cytokine release from the macrophage cell line RAW264.7. **Toxicology Letters**, v.216, n.2-3, p. 130-138, Feb. 2013.
- CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009. 354p.
- CHANG, H.H. et al. Urethane dimethacrylate induces cytotoxicity and regulates cyclooxygenase-2, hemeoxygenase and carboxylesterase expression in human dental pulp cells. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.2, p. 722-731, Oct. 2014.
- CRUVINEL, W.M. et al. Sistema imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p. 434-461, 2010.
- DONGARI-BAGTZOGLOU, A.I.; EBERSOLE, J.L. Increased presence of IL-6 and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.69, n.8, p. 899-910, Aug. 1998.
- EMMLER, J. et al. 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.
- ERTUGRUL, A.S. et al. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v.48, n.1, p. 44-51, Feb. 2013.
- ECKHARDT, A. et al. Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. **Biomaterials**, v.30, n.9, p. 1665-1674, Jan. 2009.

FERRACANE, J.L.; CONDON, J.R. Rate of elution of leachable components from composite. **Dental Materials**, v.6, n.4, p. 282-287, Oct. 1990.

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

GEURTSSEN, W.; LEYHAUSEN, G. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). **Journal of Dental Research**, v.80, n.12, p. 2046-2050, Dec. 2001.

HALVORSON, R.H.; ERICKSON, R.L.; DAVIDSON, C.L. Energy dependent polymerization of resin-based composite. **Dental Materials**, v.18, n.6, p. 463-469, Sept. 2002.

HEIL, T.L. et al. Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.29, n.5, p. 401-407, May 2002.

KOSTORYZ, E.L.; TONGA, P.Y.; CHAPPELOW, C.C. *In vitro* cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. **Dental Materials**, v.15, n.5, p. 363-373, Sept. 1999.

KOSTORYZ, E.L. et al. Effects of dental resins on TNF-alpha-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. **Journal of Dental Research**, v.80, n.9, p. 1789-1792, Sept. 2001.

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.

KRIFKA, S. et al. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. **Biomaterials**, v.34, n.19, p. 4555-4563, June 2013.

KUAN, Y.H. et al. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved in NFkB activation via PI3K/Akt Pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.11, p. 4003-4009, Nov. 2012a.

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

MATHISEN, G.H. et al. TEGDMA and filler particles from dental composites additively attenuate LPS-induced cytokine release from the macrophage cell line RAW 264.7. **Clinical Oral Investigations**, v.19, n.1, p. 61-69, Jan. 2015.

MOHARAMZADEH, K. et al. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. **Dental Materials**, v.23, n.1, p. 40-44, Jan. 2007.

MUNDY, G.R. Inflammatory Mediators and the Destruction of Bone. **Journal of Periodontal Research**, v.26, n.3pt2, p. 213-217, May 1991.

MYSAK, J. et al. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 476068, 2014.

NASJLETL, C.E.; CASTELLI, W.A.; CAFFESSE, R.G. Effects of composite restorations on the periodontal membrane in monkeys. **Journal of Dental Research**, v.62, n.1, p. 75-78, Jan. 1983.

NEVES, A.D. et al. Influence of the power density on the kinetics of photopolymerization and properties of dental composites. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.72, n.2, p. 393-400, Feb. 2005.

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

PANG, G. et al. GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression on cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 α and TNF- α . **Clinical and Experimental Immunology**, v.96, n.3, p. 437-443, June 1994.

POLYDOROU, O. et al. Elution of monomers from two conventional dental composite materials. **Dental Materials**, v.23, n.12, p. 1535-1541, Dec. 2007.

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.

ROMAGNANI, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Molecular Immunology**, v.38, n.12-13, p. 881-885, May 2002.

SCHLEDLE, A. et al. Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated? **Clinical Oral Implants Research**, v.18, n.3, p. 232-256, June 2007.

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 Science**, v.108, n.5, p. 442-448, Oct. 2000.

SCHMITZ, M.L. et al. Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, n.12, p. 2165-2175, Dec. 2011.

SCHNEIDER, L.F.; CAVALCANTE, L.M.; SILIKAS, N. Shrinkage stresses generated during resin-composite applications: a review. **Journal of Dental Biomechanics**, v.2010, n.1, p. 131630, 2010.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **Journal of Dental Research**, v.85, n.10, p. 870-877, Oct. 2006.

SMALLEY, J.W. et al. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin. **Biochemistry Journal**, v.362, n.1, p. 239-241, Feb. 2002.

TONIATO, E. et al. P164 Evaluation of pro-inflammatory cytokines, and cell growth inhibition in primary human cells culture from oral tissue treated with uretandimethacrylate (UDMA). **Cytokine**, v.59, n.3, p. 572-572, 2012.

TURNER, M.D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1843, n.11, p. 2563-2582, June 2014.

VAN LANDUYT, K.L. et al. How much do resin-based dental materials release? A me'a-analytical approach. **Dental Materials**, v.27, n.8, p. 723-747, Aug. 2011.

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Periodontitis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v.15, p. e7, Aug. 2013.