

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

Marco Antônio Xambre de Oliveira Santos

**EFEITO DE SISTEMAS ADESIVOS CONTEMPORÂNEOS NA PRODUÇÃO DE
CITOCINAS POR MONÓCITOS ESTIMULADOS POR *STREPTOCOCCUS*
*MUTANS***

Belo Horizonte

2017

Marco Antônio Xambre de Oliveira Santos

**EFEITO DE SISTEMAS ADESIVOS CONTEMPORÂNEOS NA PRODUÇÃO DE
CITOCINAS POR MONÓCITOS ESTIMULADOS POR *STREPTOCOCCUS*
*MUTANS***

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: Clínicas Odontológicas - Área Temática Prótese Dentária.

Linha de Pesquisa: Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

S237e	Santos, Marco Antônio Xambre de Oliveira Efeito de sistemas adesivos contemporâneos na produção de citocinas por monócitos estimulados por Streptococcus Mutans / Marco Antônio Xambre de Oliveira Santos. Belo Horizonte, 2017. 74 f. : il. Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia 1. Adesivos dentários. 2. Polpa dentária. 3. Citocinas - Avaliação de riscos de saúde. 4. Resinas compostas. 5. Restauração (Odontologia). 6. Monócitos. I. Andrade Junior, Ildeu. II. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título. CDU: 616.314-08
-------	---

Marco Antônio Xambre de Oliveira Santos

**EFEITO DE SISTEMAS ADESIVOS CONTEMPORÂNEOS NA PRODUÇÃO DE
CITOCINAS POR MONÓCITOS ESTIMULADOS POR *STREPTOCOCCUS
MUTANS***

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- Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra – UFMG
- 2- Profa. Dra. Márcia Almeida Lana – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 20 de fevereiro de 2017

A dissertação, 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

A Deus, pela condução de todos os caminhos os quais são impossíveis aos homens perscrutarem.

À minha amada esposa Flavia, pelo carinho e compreensão que dedicou durante todo esse tempo.

Aos meus pais, pelo suporte em que sempre estiveram presentes.

Ao meu irmão Pedro, pela inspiração diária e companheirismo em todas as áreas.

A todos os familiares, por terem sempre ajudado.

Ao Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza, meu orientador, que sempre demonstrou o exemplo profissional e dedicação. Uma grande honra ser mais uma vez orientado por esse grande profissional da Odontologia.

Ao Laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB-UFMG, em especial a doutoranda Luísa Mourão Magalhães, pela presença constante, e à professora Walderez Ornelas Dutra, por todo o suporte e apoio.

À colaboração da doutoranda Natália Rocha Guimarães e dos professores Paula Prazeres Magalhães e Luiz de Macêdo Farias, do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, no cultivo das bactérias.

Às agências de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento.

A todos que estiveram presente durante esse processo colaborando de alguma forma com o crescimento e amizade.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”
(ARTHUR SCHOPENHAUER)

RESUMO

Sistemas adesivos à base de monômeros resinosos polimerizáveis são necessários para adesão da resina composta ao tecido dentário. Alguns dentes evoluem para necrose pulpar após confecção dessas restaurações. Diversos estudos mostram que a polimerização desses materiais é incompleta e que monômeros residuais liberados apresentam capacidade citotóxica e genotóxica. Considerando a frequente inflamação pulpar em resposta às bactérias cariogênicas, a hipótese deste trabalho foi que a presença de substâncias liberadas dos sistemas adesivos poderia afetar as células do infiltrado inflamatório e interferir nos mecanismos de combate microbiano e proteção do tecido pulpar. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de substâncias liberadas por diferentes sistemas adesivos resinosos na viabilidade celular e na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados *in vitro* com *Streptococcus mutans*. Para isso, células mononucleares de sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis foram estimuladas com *S. mutans* e, em seguida, incubadas com sobrenadantes obtidos dos sistemas adesivos SingleBond Universal (SBU) ou Clearfil SEBond (CSEB) por 8 horas. Foram realizadas quantificações de células marcadas para Anexina V e 7AAD e de monócitos imunomarcados para a molécula CD14 e para as citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α , por meio de citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que nenhum tratamento afetou significativamente a apoptose em monócitos. A adição de sobrenadante de SBU aumentou a frequência de monócitos expressando IL-8 e reduziu a de monócitos produtores de IL-10. A estimulação com *S. mutans* aumentou a frequência de monócitos produtores de IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α , enquanto a adição do sobrenadante de CSEB diminuiu a frequência de monócitos expressando IL-6 e TNF- α . Nossos dados sugerem que produtos liberados de diferentes sistemas adesivos podem interferir de forma distinta no controle das reações imunoinflamatórias pulpares mediadas pelas citocinas, tanto na presença quanto na ausência de estimulação por bactéria cariogênica.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Adesivos Dentários. Monócitos. Citocinas. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Adhesive systems based on polymerizable monomers are required for adhesion of the composite resin to dental tissue. Some teeth develop into pulpal necrosis after making these restorations. Several studies show that the polymerization of these materials is incomplete and that residual monomers released have cytotoxic and genotoxic capacity. Considering frequent pulpal inflammation in response to cariogenic bacteria, the presence of substances released from adhesive systems could affect the cells of the inflammatory infiltrate and interfere with microbial combat mechanisms and protection of pulp tissue. The objective of this work was to evaluate the effect of substances released by different resinous adhesive systems on cell viability and cytokine production by human monocytes stimulated *in vitro* with *Streptococcus mutans*. To this end, peripheral blood mononuclear cells from 10 healthy subjects were stimulated with *S. mutans* and then incubated with supernatants obtained from the SingleBond Universal (SBU) or Clearfil SEBond (CSEB) adhesive systems for 8 hours. Immunofluorescence and quantification of CD14⁺ monocytes expressing Annexin V and 7AAD and producing cytokines IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α were performed by flow cytometry. Our results showed that any condition significantly affected the apoptosis in monocytes. SBU supernatant increased the frequency of monocytes expressing IL-8 and reduced the frequency of monocytes expressing IL-10. Stimulation with *S. mutans* increased the frequency of monocytes producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α , but the addition of CSEB supernatant decreased the frequency of monocytes expressing IL-6 and TNF- α . Our data suggest that products released by different adhesive systems may interfere in a distinct way in the pulp immunoinflammatory response mediated by cytokines.

Keywords: Cytotoxicity. Dental Adhesive. Monocyte. Cytokine. *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Adesivos resinosos	15
1.2 Resposta imunoinflamatória e reações teciduais pulpares	17
1.3 Efeitos biológicos dos materiais resinosos odontológicos	22
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 ARTIGO	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
ANEXO A - Composição dos sistemas adesivos segundo os fabricantes	67
ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas	69
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adesivos resinosos

Os materiais resinosos começaram a ser usados em 1940 e logo suas características clínicas e biológicas tornaram-se alvo de discussão e pesquisa, após várias polpas dentárias terem se tornado necróticas e os dentes necessitarem de tratamento endodôntico. Com o passar dos anos, com os estudos de Buonocore (1955) e Bowen (1958), começaram a ser desenvolvidos adesivos para fixar as resinas ao esmalte dentário. Em seguida, foram desenvolvidos estudos para produção de adesivos para dentina. Com o passar do tempo, criaram-se as técnicas de condicionamento total, onde se condiciona com ácido fosfórico a 35-37% todo o esmalte e dentina e se aplica o adesivo; a técnica de agente de preparação (primer) condicionador e adesivo; e a técnica “All-in-one” onde temos todos os componentes em um só produto (INOUE et al., 2001; PERDIGÃO 2007; PASHLEY et al., 2011).

O desenvolvimento desses materiais tem sido tão rápido que a prática clínica começou a superar as pesquisas laboratoriais. Apenas testes de biocompatibilidade, propriedades mecânicas e físicas são realizadas para verificar se o produto é seguro e efetivo (MJOR; FERRARI, 2002). Ainda existem algumas preocupações quanto às reações da polpa, hipersensibilidade, longevidade das restaurações e a manipulação desses materiais (MJOR; FERRARI, 2002). Estudos recentes mostram também o potencial desses agentes adesivos de causar inflamação pulpar (SCHEFFEL et al., 2015)

Todas as técnicas de utilização de adesivos possuem três passos principais que são responsáveis para a durabilidade da adesão entre o dente e a restauração: condicionamento, uso de um agente de preparação (primer), e adesão (bond). O condicionamento envolve o uso de soluções ácidas no esmalte/dentina para desmineralização parcial e criação de uma superfície mais propícia ao processo de adesão. O primer é um composto que mistura monômeros hidrofílicos com solventes promovendo o molhamento da estrutura dental. O bond contém monômeros hidrofóbicos que permitem a adesão da resina composta (OZER; BLATZ, 2013). Pode-se utilizar de várias estratégias de adesão, as quais são classificadas quanto ao número e combinação de passos para o tratamento: Condicionamento total em três passos de sistema adesivo; Condicionamento total em dois passos de sistema

adesivo; Sistema auto-condicionante de dois passos; Sistema auto condicionante de um passo. No condicionamento total em três passos, temos separados o ácido fosfórico que é aplicado em esmalte e dentina, o primer que é colocado em seguida e o bond em uma terceira etapa. No condicionamento total em dois passos, temos o ácido separado da mesma maneira que o anterior, porém o primer e o bond estão em um frasco único. No sistema adesivo auto-condicionante, o primer possui moléculas ácidas que irão modificar a *smear-layer* permitindo separadamente aplicar o bond para a adesão. No sistema auto-condicionante de um passo, temos apenas um líquido que possui todos os componentes necessários para o processo (INOUE et al., 2001; PERDIGÃO, 2007; PASHLEY et al., 2011).

A técnica de condicionamento com ácido fosfórico remove a *smear layer* e desmineraliza a dentina. Essa dentina desmineralizada é um importante passo para a adesão e formação da camada híbrida. Depois de lavado o ácido, a dentina é suavemente seca e, então, são colocados o primer e depois a camada de adesivo ou compostos que já contém o primer e adesivos combinados (PASHLEY et al., 2011).

A técnica auto-condicionante (primer condicionador e adesivo) e a técnica de “*All-in-one*” não removem a *smear layer*. Esta camada é modificada pelos componentes ácidos presentes nos sistemas e integrada ao substrato adesivo (FRANKENBERGER et al., 2008; GIANNINI et al., 2015).

O adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray) que foi estudado nesse trabalho, pertence ao grupo de sistemas de adesão auto-condicionante, sendo composto por um primer ácido com monômeros MDP e o adesivo, em frascos separados. Sua utilização está indicada em restaurações onde o dente está seco, não sendo necessário o controle de umidade devido à sua característica ácida. É um dos sistemas adesivos mais estudados na literatura científica (WATANABE; NAKABAYASHI; PASHLEY, 1994).

Com a evolução dos materiais adesivos, o Single Bond Universal (3M ESPE) foi lançado com o intuito de ser utilizado tanto na técnica úmida (com condicionamento ácido da dentina), quanto na técnica seca (onde os monômeros ácidos realizam a adesão). Todos os seus componentes encontram-se em um só frasco, facilitando sua utilização (PERDIGÃO et al., 2014).

Os adesivos na sua composição possuem monômeros como a parte mais importante, que após a reação de polimerização irão se unir transformando-se em

polímeros. O Bis-fenol Glicidil Dimetacrilato (BisGMA), o Tri-etileno Glicol Dimetacrilato (TEGDMA), o Uretano Dimetacrilato (UDMA), o 10-Meta-Criloiloxidecil Diidro-Genofosfato (10-MDP) e o 2-Hidroxietyl Metacrilato (HEMA) são alguns dos monômeros utilizados (GAJEWSKI et al., 2012; YOSHIHARA et al., 2013). Esses sistemas possuem também fotoiniciadores que são geralmente moléculas que tem ligações químicas de baixa energia de dissociação que formarão radicais em algumas circunstâncias. Esses radicais irão iniciar a reação de polimerização. Na composição, também são adicionados inibidores. Algumas moléculas iniciadoras podem se decompor ou reagir espontaneamente e formar os radicais. Os inibidores irão reagir com esses radicais e impedir o processo de polimerização. Para que os monômeros resinosos possam penetrar a dentina desmineralizada ou alterar a *smear layer* de maneira adequada, é adicionado um solvente (água, álcool ou acetona) na composição química desses produtos. A principal função é justamente permitir que os componentes se infiltrem no substrato, permitindo a adesão (VAN LANDUYT et al., 2007). Existem também outros componentes como carga inorgânica, co-iniciadores e óxidos (PERDIGAO, 2007; PERDIGAO et al., 2014; GIANNINI et al., 2015).

1.2 Resposta imunoinflamatória e reações teciduais pulpares

A resposta imunoinflamatória é um conjunto de ações celulares e moleculares de defesa contra agressões, que promovem alterações morfológicas e bioquímicas. Essas ações ocorrem nos tecidos, células e vasos sanguíneos como consequência de uma injúria ou infecção. O sistema imune é composto de duas divisões principais: o sistema imune inato que é a primeira linha de defesa, atuando de forma rápida a agressão, e o sistema imune adaptativo como uma segunda linha de defesa protegendo contra uma nova exposição ao mesmo patógeno (CRUVINEL et al., 2010).

A resposta imune específica é caracterizada por mecanismos de reconhecimento de antígenos e os linfócitos são as células que possuem essa especificidade. Essas importantes células são divididas em dois grupos: linfócitos B e linfócitos T. O primeiro grupo é responsável por produzir anticorpos para antígenos específicos. O segundo grupo possui uma subdivisão em que podem ser classificados como linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos duplo-negativos.

Os $LTCD4^+$ possuem um papel de suma importância visto que eles são os responsáveis por organizar a resposta imune reconhecendo o antígeno. Após o reconhecimento, esses mesmos linfócitos secretam várias citocinas que regulam a atividade e intensidade da resposta ativando ou desativando várias outras células (JONTELL et al., 1998).

Um importante componente da resposta imune pulpar são as células dendríticas, derivadas de células hematopoiéticas, cujas características são a morfologia dendrítica, alta mobilidade, capacidade de fagocitose limitada e uma alta capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos T, via moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (JONTELL et al., 1998; GATTI; PIERRE, 2003). Os estudos de Eklof et al. (1992), Jontell e Bergenholtz (1992), Jontell et al. (1994) e Jontell et al. (1998) mostraram que as células dendríticas da polpa dental de ratos apresentam importante papel na ativação e proliferação dos linfócitos, iniciando a resposta imune adquirida ao migrarem para os linfonodos.

Os macrófagos são células com grande capacidade fagocitária que produzem uma série de substâncias biológicas: enzimas, citocinas e fatores de crescimento (GUIDOS; SINHA; LEE, 1987). Atuam também como célula apresentadora de antígeno, mas de maneira menos efetiva do que as células dendríticas (PAVLI, 1993). Ao ativar os linfócitos, estes últimos liberam citocinas que fazem com que os macrófagos se tornem mais eficientes. Nos tecidos, a maioria dos macrófagos não entra no sistema linfático, participando com sua capacidade de apresentar antígenos, na resposta imune secundária onde interagem com linfócitos T ativos no próprio sítio inflamatório (JONTELL et al., 1998).

Para iniciar uma resposta imune, os leucócitos e outras células dos tecidos extravasculares conseguem produzir uma série de mediadores inflamatórios, como citocinas, eicosanoides e enzimas (ABBAS; LICHTMAN, 2007; CRUVINEL et al., 2010). As citocinas são polipeptídios produzidos em resposta a agentes agressores como microrganismos e antígenos estranhos, que se ligam a receptores de membrana específicos e atuam em diferentes tipos celulares causando diversos efeitos. 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. Essas proteínas atuam de formas distintas, sendo elas pró-inflamatórias ou anti-

inflamatórias (WELLNER et al., 2012). Os materiais dentários, muito especificamente as resinas compostas e os adesivos resinosos, são produtos que possuem um potencial inflamatório já descrito por diversos trabalhos (COX et al., 1996; BAKOPOULOU; PAPADOPOULOS; GAREFIS, 2009; ARANHA et al., 2010).

Durante o processo inflamatório são liberadas citocinas como interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Essas citocinas, como descrito anteriormente, podem ser divididas em dois grupos. As pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) tem como função estimular a migração de células do sistema imune, ativar a atividade fagocitária, estimular a produção de mais citocinas por outras células e a secreção de collagenase, induzir secreção de anticorpos pelos plasmócitos e modular a reabsorção óssea (VARELLA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2007). Mais especificamente, IL-1, IL-6, TNF- α são os clássicos mediadores da inflamação, estimulando alterações vasculares, recrutando leucócitos e controlando a resposta imunológica celular (ROMAGNANI, 2002).

O grupo das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) tem como função desativar os macrófagos e os linfócitos, inibir a produção e bloquear o efeito de citocinas pró-inflamatórias e inibir a angiogênese e a produção de prostaglandinas (VARELLA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2007). A produção de citocinas pelas células determina os efeitos biológicos causados nos sítios de infecção, como o combate aos antígenos e microrganismos e a destruição tecidual (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

O TNF- α é uma potente citocina secretada principalmente por monócitos. A principal função biológica do TNF- α é o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de inflamação e a ativação dessas células. Atua nas células do endotélio vascular, fazendo com que expressem moléculas de adesão, permitindo o processo de quimiotaxia de leucócitos. Induz a produção de outras citocinas e moléculas de adesão e atua principalmente nos macrófagos estimulando a fagocitose (TURNER et al., 2014). Além do seu papel durante os processos inflamatórios, o TNF- α induz a apoptose em alguns tipos celulares (SIMPSON; CASEY, 1989).

A IL-1 atua de modo semelhante ao TNF- α no recrutamento de leucócitos do sangue por estimular a expressão de moléculas de adesão no endotélio. Esta citocina é expressa por vários tipos celulares, incluindo os macrófagos, e estimula a

diferenciação e ativação dos linfócitos T auxiliares, a ativação de linfócitos B e células *Natural Killer* e a proliferação celular na medula óssea (SCHMITZ et al., 2011).

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 (ABBAS; LICHTMAN, 2007). As principais fontes de IL-12 são os fagócitos mononucleares ativados e células dendríticas. A IL-12 é um 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).

A IL-6 é secretada por linfócitos T auxiliares, macrófagos e fibroblastos (TURNER et al., 2014). Sua secreção é estimulada pelas citocinas IL-1 e TNF- α (PANG et al., 1994). Ela é capaz de estimular a diferenciação dos linfócitos B, a produção de anticorpos, induzir proliferação dos linfócitos T e regular a síntese de proteínas da fase aguda da inflamação (SCHMALZ; SCHWEIKL; HILLER, 2000; ECKHARDT et al., 2009).

A IL-10, por sua vez, é uma citocina do grupo anti-inflamatório. É produzida principalmente por macrófagos ativados atuando como regulador de feedback negativo. Atua inibindo a produção de outras citocinas, como TNF- α , e a expressão de moléculas de superfície co-estimuladoras (ECKHARDT et al., 2009). Além disso, é capaz de desativar os macrófagos e linfócitos e inibir a angiogênese (ROMAGNANI, 2002). Age de forma a terminar as respostas ativadas por outras citocinas e permitir o retorno à homeostase ao término da infecção microbiana (SABAT et al., 2010).

Existem muitos fatores anatômicos e fisiológicos que levam a acreditar que o tecido pulpar é limitado em combater uma invasão bacteriana ou responder a um estímulo nocivo. Dawson, Amjad e Fransson (2015), em revisão sistemática de literatura, mostrou, através de 6 estudos, uma incidência de 2-12% de alterações pulpares em dentes tratados por restaurações em resina composta. Estímulos químicos vindos pelos túbulos dentinários são capazes de fazer com que haja um aumento nas células que expressam moléculas de MHC de classe II, indicando que as células estão respondendo a agressão. Ohshima et al. (1995) perceberam

através de seus estudos que as células dendríticas respondem a agressões vindas pelos túbulos dentinários, se acumulando quando a dentina reparadora era invadida por bactérias. 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 (JONTELL et al., 1998).

A cárie dentária é uma doença de infecção multibacteriana, onde bactérias como *S. mutans*, espécies de *Actinomyces* e de *Lactobacillus* iniciam o biofilme aderido à superfície do esmalte dentário. Após a adesão dessas bactérias, outras começam a colonizar a superfície, como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Em estágios mais avançados, outras bactérias como *P. endodontalis* são encontradas nas cavidades cariosas. A reação pulpar ocorre devido aos produtos bacterianos e às próprias bactérias que alcançam a câmara pulpar por meio dos túbulos dentinários, ativando células e levando a inflamação (KRZYSCLAK et al., 2014; ARUNI et al., 2015).

Restaurar dentes envolve preparação de áreas, normalmente contaminadas por bactérias, com instrumentos cortantes, colocação de algum material químico para substituir a estrutura perdida e consequentemente agressões às células pulpares. Ocorre então, uma alteração nas células e nos tecidos como formação de dentina terciária e esclerose dentinária (BJORNDAL; MJOR, 2001).

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 (BJORNDAL; MJOR, 2001).

O *S. mutans* é um dos principais microrganismos cariogênicos em lesões iniciais e em infiltrações marginais de restaurações devido ao seu alto poder de adesão aos materiais restauradores e ao esmalte dentário (HAHN, 2000). Em resposta aos produtos desta bactéria, especialmente o ácido lipoteicoico e os peptidoglicanos, células imunocompetentes pulpares, como as células dendríticas, secretam citocinas como TNF- α e IL-12, favorecendo a montagem de resposta imune adquirida celular tipo Th1 (HAHN, 2000). Outros autores descreveram a liberação de IL-1, IL-8, TNF- α e IL-12 também em resposta a estímulos advindos do *S. Mutans* (HAHN, 2000; ENGELS-DEUTSCH et al., 2003; HONG et al., 2014; ARSLAN et al., 2015; NEDELJKOVIC et al., 2017)

O *S. mutans* possui várias moléculas de superfície, que podem atuar como fatores de virulência, permitindo sua adesão à película de saliva sobre os dentes, formação do biofilme dental, produção de ácidos, invasão de túbulos dentinários e tecido pulpar, interação com as células pulpares e, após difusão periapical, interação com células do ligamento periodontal (ENGELS-DEUTSCH et al., 2003). O ácido lipoteicóico, encontrado na maior parte de sua parede celular, é considerado o fator responsável pela adesão da bactéria a hidroxiapatita, além de ser uma molécula estimuladora da resposta imunoinflamatória (HONG et al., 2014). Além disso, o *S. mutans* possui a habilidade de se reproduzir e sobreviver em meio ácido, sem eliminar a possibilidade de sobrevivência em meio alcalino (KRYSCIAK et al., 2014).

Muitos estudos afirmam que a inflamação pulpar pode ser causada pela falha na adesão do sistema adesivo à superfície dentinária, o que causaria micro infiltração bacteriana nessa área (COX et al., 1996; BERGENHOLZ, 2000; LYGRE; VORLAND; HOLMSEN, 2001). As bactérias, especialmente *S. mutans*, podem causar pulpite pela indução da produção de citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α pelos macrófagos, fazendo com que haja migração de leucócitos e estimulação da atividade fagocitária, como demonstrada através de um estudo realizado em células mononucleares de camundongo, onde os pesquisadores estimularam as células com as bactérias e realizaram a análise através do teste de proteção do RNase (JIANG; SCHILDER, 2002). Ao mesmo tempo, um estudo mostrou *S. mutans* é capaz de induzir respostas Th1 estimulando a expressão de IL-12, IFN-gama E TNF- α em células mononucleares humanas. A produção exuberante dessas citocinas estimuladas por *S. mutans* poderia contribuir para o processo patológico da infecção. Por outro lado foi demonstrado que os monócitos podem produzir IL-10 como mecanismo regulador importante da inflamação, quando estimulados por outra bactéria cariogênica, o *P. endodontalis* (JIANG; MAGLI; RUSSO, 1999).

1.3 Efeitos biológicos dos materiais resinosos odontológicos

Os monômeros resinosos são capazes de promover o crescimento e a proliferação de bactérias cariogênicas, contribuindo ainda mais para a inflamação pulpar e a formação de cáries secundárias (HANSEL et al., 1998; VAN MEERBEEK et al., 2003). Kawai e Tsuchitani (2000) reportaram que os monômeros, além de aumentarem o número de bactérias, são capazes de aumentar a atividade da

glicotransferase, enzima bacteriana responsável pela formação do glicano que tem um papel fundamental na adesão bacteriana e na formação da placa. Já Ebi et al. (2001) relataram que os monômeros Methacryloyloxydodecylpyridinium Bromide (MDPB) possuem uma atividade inibitória de acumulação de placa bacteriana, atuando de maneira antagônica ao descrito anteriormente. O MDPB, segundo os autores, tem o potencial de diminuir a atividade da glicotransferase, o que gera uma menor adesão da placa bacteriana e conseqüentemente a sua formação. Uma revisão sistemática de literatura sobre os monômeros bactericidas mostrou potencial de utilização dos mesmos em restaurações dentárias, embora haja necessidade de pesquisas e estudos clínicos para confirmar a efetividade desses materiais na prevenção de lesões pulpares. Os monômeros pesquisados foram o 2- dimethyl-2-dodecyl-1-methacryloxyethyl ammonium iodine (DDMAI); 2-methacryloyloxyethyl dimethylammonium (IDMA1); 2,2-bis (methacryloyloxyethyl dimethylammonium) (IDMA2); dimethyl amino dodecylmethacrylate (DMADDM); dimethylamino hexylmethacrylate (DMAHM); methacryloyl ethylcetyldimethylammonium chloride (DMAE-CB); e 12-methacryloyloxy dodecylpyridinium bromide (MDPB). Os pesquisadores acharam que os monômeros polimerizados na matriz resinosa são capazes de inibir o crescimento bacteriano quando essas entram em contato com os monômeros. Inclusive, esses monômeros obtiveram uma resposta favorável na inibição do *Streptococcus Mutans*, um dos microrganismos atuantes no processo da cárie (COCCO et al., 2015).

Alguns monômeros resinosos livres, tais como 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA), os quais são amplamente utilizados na composição química dos adesivos dentinários, podem causar efeitos tóxicos específicos sobre células pulpares devido à sua alta capacidade de difusão. Estes mesmos componentes, isolados ou combinados com resinas restauradoras, são capazes de se difundir através da dentina para alcançar a polpa dentária em concentrações que podem causar danos a este tecido (HANKS et al., 1994; BOUILLAGUET et al., 1996; GERZINA; HUME, 1996).

Hamid e Hume (1997) indicaram em seus estudos que a espessura de dentina remanescente é algo a se considerar quando avaliamos a difusão dos monômeros resinosos. Em as espessuras de dentina estudadas, houve infiltração dos monômeros, principalmente nas primeiras horas. Com a diminuição da espessura da parede de dentina o grau de monômeros que atravessaram a parede

aumentou tanto para o HEMA quanto para o TEGDMA. Lanza et al. (2008) pesquisaram sobre a difusão e citotoxicidade dos adesivos auto-condicionantes. Os componentes desses sistemas adesivos foram capazes de atravessar a dentina e alterar o metabolismo celular.

Segundo Kim et al. (2013), a conversão de monômeros resinosos em polímeros, principalmente dos sistemas adesivos que ficam em contato direto com a dentina e seus túbulos, é alterada quando da aplicação de uma camada de resina composta. Como a resina composta e os sistemas adesivos possuem o mesmo mecanismo de polimerização, ao aplicar a resina e polimerizar é esperado uma polimerização secundária dos monômeros que não reagiram dos sistemas adesivos. Esse grau de conversão é aumentado demonstrando o porquê da sua efetividade clínica, visto que os sistemas adesivos são utilizados para aplicar uma camada de resina sobre ele.

Gwinnett e Tay (1998) aplicaram adesivos resinosos em polpas de dentes humanos expostas mecanicamente. Os autores observaram a presença de partículas dentro da polpa, induzindo a uma resposta de corpo estranho com infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes, demonstrando assim o potencial inflamatório desses produtos.

Costa et al. (1999), em seus estudos em células odontoblásticas de ratos, perceberam que após a polimerização dos adesivos e lavagem com solução tampão fosfato-salina, os efeitos citotóxicos diminuíram por causa da diluição dos agentes ácidos que compõem esses materiais resinosos. Além disso, os macrófagos e as células gigantes provavelmente digerem os monômeros residuais que estão na polpa dentária.

Um estudo *in vitro* com barreiras de dentina demonstrou o potencial de difusão do HEMA, devido ao seu baixo peso molecular e sua alta solubilidade em água. Para realização do experimento os pesquisadores utilizaram um dispositivo que simula a câmara pulpar. Através desse método foi possível avaliar tanto a passagem dos monômeros quanto a estimulação celular *in vitro* com a toxicidade do material às células pulpares humanas. Ainda neste estudo, a adição de MDPB nas concentrações de 1%, 2% e 5% nos materiais restauradores não alteraram a citotoxicidade (IMAZATO et al., 2000).

Uma revisão sistemática da literatura mostrou ocorrência de complicações pulpares em 2 a 12% dos dentes tratados com restaurações em resina composta ou

amálgama. Em quatro estudos avaliados, comparando as alterações pulpares entre restaurações em resina composta e amálgama, três mostraram maiores complicações em dentes tratados com resina do que outros materiais, enquanto um estudo reportou maiores problemas em dentes tratados com amálgama (DAWSON; AMJAD; FRANSSON, 2015).

Baratieri e Ritter (2001) observaram que, em uma amostra de 726 dentes tratados com resina composta, 24% apresentaram sensibilidade pós-operatória por até 30 dias, mas nenhuma alteração pulpar irreversível foi constatada.

Estudo retrospectivo de 12 anos avaliou 1949 restaurações extensas (747 em resina composta e 1202 em amálgama) e encontrou taxa de 3,5% de alterações pulpares com necessidade de tratamento endodôntico, em dentes restaurados com resina composta (OPDAM et al., 2010).

Scheffel et al. (2015) realizaram restaurações em resina composta com profundidade de 2,5 mm, utilizando sistemas adesivos à base de água e álcool, em pré-molares hígidos que seriam extraídos por motivos ortodônticos. Após 48 horas, os dentes foram extraídos, processados em laboratório e analisados por microscopia. Os cortes histológicos mostraram agressão moderada aos tecidos pulpares, com infiltrado inflamatório.

Ainda são necessários mais estudos sobre os efeitos biológicos dos diferentes tipos de sistemas adesivos contemporâneos, devido à sua ampla utilização, para garantir a biocompatibilidade com os tecidos e células.

Infiltrações nas restaurações em resina composta são comuns na prática odontológica causando lesões cariosas sob restaurações e levando à necessidade de substituição das mesmas. *S. mutans* são microrganismos que invadem facilmente essas fendas, participando ativamente do processo carioso nas infiltrações de restaurações. Assim, a hipótese testada neste trabalho foi que produtos liberados por diferentes sistemas adesivos resinosos são capazes de alterar a produção de citocinas por monócitos humanos estimulados ou não pela bactéria cariogênica *S. mutans*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de substâncias liberadas pelos sistemas de adesivos resinosos SingleBond Universal (3M ESPE) e Clearfil SEBond (Kuraray) na viabilidade celular e na produção de citocinas por monócitos estimulados *in vitro* com *Streptococcus mutans*.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar e comparar a citotoxicidade de substâncias liberadas pelos diferentes sistemas adesivos resinosos em células mononucleares de sangue periférico estimuladas ou não com *S. mutans*.
- b) avaliar e comparar o efeito de substâncias liberadas pelos diferentes sistemas adesivos resinosos nas frequências de monócitos produtores das citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α ;
- c) avaliar e comparar o efeito de substâncias liberadas por diferentes sistemas adesivos resinosos nas frequências de monócitos produtores das citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α , após estimulação com *S. mutans*.

3 ARTIGO

Resinous adhesive systems differentially affect the production of cytokines by human monocytes stimulated with *Streptococcus mutans* in vitro

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

Resinous adhesive systems differentially affect the production of cytokines by human monocytes stimulated with *Streptococcus mutans* in vitro

Marco Antonio Xambre de Oliveira Santos^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 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 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^d Graduate Program in Medicine and Biomedicine, Institute for Education and Research, Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Núcleo de Ensino e Pesquisa, Instituto Mário Penna, Belo Horizonte, Brazil.

^e Department of Microbiology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 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: The polymerization of adhesive systems based on resinous monomers is incomplete and the residual monomers that have been released have a cytotoxic capacity. Some teeth develop into pulp necrosis after composite resin restorations. Considering frequent pulpal inflammation in response to cariogenic bacteria, substances released from the patches could affect the cells of the inflammatory infiltrate and interfere with the mechanisms of microbial combat and the protection of pulpal tissue. The objective of this work was to evaluate the effect of substances released by different resinous adhesive systems on cell viability and cytokine production by human monocytes stimulated in vitro with *Streptococcus mutans*.

Method: Peripheral blood mononuclear cells from 10 healthy subjects were stimulated with *S. mutans* and then incubated with supernatants obtained from the SingleBond Universal (SBU) or Clearfil SEBond (CSEB) adhesive systems for eight hours. Reactions of labeling for Annexin V and 7AAD and quantification of CD14 + monocytes producing cytokines IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α were performed by flow cytometry.

Results: No condition significantly affected apoptosis in monocytes. SBU supernatant increased the frequency of monocytes expressing IL-8 and reduced that of monocytes expressing IL-10. Stimulation with *S. mutans* increased the frequency of IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α producing monocytes but the addition of the CSEB supernatant reduced the frequency of IL-6 expressing monocytes and TNF- α .
Significance: Products released from different adhesive systems may interfere in the control of cytokine-mediated immunoinflammatory pulp reactions, both in the presence and absence of stimulation by cariogenic bacteria.

Keywords: Cytotoxicity. Dental Adhesives. Monocytes. Cytokines. *Streptococcus mutans*.

1. Introduction

In order to perform composite resin restorations, it is necessary to use a bonding agent: the adhesives. With advances in technology, adhesive systems have gained the possibility of being used in new formulations and conditions such as all-in-one systems [1-3]. Adhesive systems are composed of a small amount of inorganic filler and organic matrix, which generally contains methacrylate monomers such as Bis-phenol Glycidyl Dimethacrylate (BisGMA), Tri-ethylene Glycol Dimethacrylate (TEGDMA), Urethane Dimethacrylate (UDMA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). More recently, 10-Meta-Criloiloxydecyl Dihydro-Genophosphate (10-MDP) has been introduced into the adhesive systems [2,3].

In addition to the monomers, other substances, such as activators, photoinitiators, polymerization inhibitors and solvents [4], are also released even after photopolymerization, with potential for cytotoxicity [5]. These components are able to diffuse through the dentinal tubules and reach the dental pulp at concentrations that can cause damage to this specialized connective tissue [6]. Several studies have shown that resinous monomers are capable of interfering in the production of cytokines and other inflammatory mediators by several cell types (5-8).

In many teeth with indication for adhesive restorations, cariogenic bacteria such as *Streptococcus mutans* are already present in the dentin that is affected by caries, reaching the pulp tissue and inducing the inflammatory process [9,10]. *S. mutans* and their products are able to induce the production of the proinflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-12 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by macrophages, that there is a migration of cells and stimulation of phagocytic activity in pulp tissue [9].

Cytokines and other inflammatory mediators secreted by pulp cells and inflammatory infiltrate control mechanisms to combat microorganisms and tissue destruction [11]. Due to inflammation, some teeth evolve to necrosis after resinous restorations with adhesive systems [12,13]. Both cariogenic bacteria and products released from adhesive systems carried by the dentin tubules can interfere in the pulp microenvironment, influencing the cellular reactions in a combined manner. Thus, it is possible that adhesive substances influence the inflammatory response, affecting the fight against microorganisms and the integrity of the pulp tissue. In the literature, there are no studies evaluating the effect of contemporary resinous adhesive systems on the production of cytokines by human leukocytes stimulated with *S. mutans*.

The objective of this study was to evaluate the effect of substances released by the contemporary adhesive systems SingleBond Universal (3M ESPE) and Clearfil SEBond (Kuraray) in the production of cytokines by human monocytes stimulated or not by *S. mutans*.

2 Materials and methods

2.1 Adhesive Systems

In this study, we evaluated the resinous adhesive systems: SingleBond Universal (3M ESPE) (SBU) and Clearfil SEBond (Kuraray) (CSEB).

Adhesive systems were applied on glass coverslips 15 mm in diameter according to manufacturers' instructions in a sterile environment. For the SBU system, 20 μ L of the adhesive was applied with a sterile tip of the pipette over the entire surface of the cover slip and then the material was photopolymerized for 20 seconds. For the CSEB system, 4 μ L of the primer was applied over the entire

surface of the cover sheet and the time for evaporation of the solvent of 15 minutes in a laminar flow hood was employed. Then, 20 μ L of the adhesive was applied over the primer layer and the system was photopolymerized for 20 seconds. For both systems, a high power photopolymerizer was used (Bluephase G2, 1200 Watts, Ivoclar Vivadent) and was positioned 3 mm from the cover slip. After photopolymerization, each coverslip was placed in a 24-well flat bottom plate and dipped in a 600 μ L RPMI medium containing 100 IU / mL of potassium penicillin G and 100 μ g / mL streptomycin. After 24 hours incubation in a humid oven at 37°C, 5% CO₂, the supernatants containing substances released from the adhesive systems were collected with the aid of a sterile pipette and frozen at -80°C for use in the experiments.

2.2 Preparation of bacteria

Streptococcus mutans (ATCC 25175) was grown in Tryptic Soy Agar (TSA - Difco, Sparks, MD, USA) enriched with 5% sheep blood in microaerophilia (candle method) at 37°C for 48 hours. Then, the bacteria were collected into tubes containing Brucella Broth medium (BBL Sparks, MD, USA) and 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 a sodium phosphate-saline (PBS) buffer (1500 X g, 10 minutes), inactivated by incubation at 100°C for 10 minutes, and resuspended in Roswell Park Memorial Institute 1640 (medium RPMI).

2.3 Obtaining peripheral blood mononuclear cells

This study was approved by the Research Ethics Committee of PUC Minas (CAAE: 54109216.5.0000.5137) and conducted in accordance with current regulations. 10 mL of blood were collected from ten healthy volunteer donors in 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 immune inflammatory response, such as anti-inflammatories and immunosuppressive drugs. To obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC), blood was diluted in 1:1 phosphate-buffered saline (PBS) and applied to 10 ml of Ficoll-Paque (Pharmacia). After centrifugation at 200 g for 40 minutes at 20°C for density gradient formation, the PBMCs were collected, washed three times with PBS (200 X g, 10 minutes, 4°C) and resuspended in complete medium (RPMI plus 2 mM L-glutamine, 100 ul / ml potassium penicillin G and 100 µg/ml streptomycin and 5% normal human serum).

2.4 MTT assay

To evaluate the cytotoxicity of the products released by the adhesive systems, 2x10⁵ PBMCs were added to the wells of flat bottom 96 well plates and supernatants of SBU and CSEB were added at the final dilutions of 1:2 and 1:3 in complete RPMI medium. After 20 hours in a humid oven at 37°C, 5% CO₂, the cells were submitted to the functional evaluation colorimetric test to analyze the mitochondrial activity. 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 a final concentration of 10% v/v, and cells were incubated for an additional four hours at 37°C, 5% CO₂. The formazan precipitates were dissolved with an addition of 100 µL

dimethylsulfoxide (DMSO) and after homogenization, a wavelength absorbance reading of 575 nm was measured on a plate reader (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Data were expressed as a percentage of viable cells relative to the control (PBMC with RPMI only).

2.5 Stimulation of PBMCs with *S. mutans* and supernatants of resin cements

To verify the effect of the substances released by the adhesive systems on PBMC apoptosis and the production of cytokines by monocytes, 2.5×10^5 PBMC were incubated in 96-well U-bottom pots for one hour in an oven at 37°C, 5% CO₂. Then, supernatant from the adhesive systems (SBU or CSEB) was added in the ratio of 1:3 and incubation was performed for another seven hours. 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 one hour in a stove at 37°C, 5% CO₂. Then, supernatant from the adhesive systems (SBU or CSEB) was added in the ratio of 1:3 and incubation was performed for another seven hours. In the negative control group, the PBMCs received only complete RPMI medium and in the positive control group (Sm), the PBMCs were incubated with *S. mutans*. In wells intended for intracytoplasmic immunoconjugation of cytokines, Brefeldin A (1 µg / mL) (E Biociensce, San Diego, CA, USA) was added four hours before the end of the incubation.

Thus, we obtained 06 experimental conditions for PBMC from each individual donor: 1) Control (RPMI only), 2) SBU, 3) CSEB, 4) Sm, 5) Sm + SBU, 6) Sm + CSEB.

2.6 Quantification of apoptotic cells

To verify the effect of *S. mutans* and the substances released by resin cements on cell apoptosis, 3×10^5 PBMCs from each experimental condition cited above were stained using the Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (BioLegend). PBMC were washed twice with cold Cell Staining Buffer (BioLegend) (eight minutes, 200 g, 4°C) and then resuspended in 100 µl of Annexin V Binding Buffer (BioLegend). APC conjugated Annexin V, 7-amino-actinomycin D (7-AAD) Viability Staining Solution, and bv-421 anti-human CD14 antibody (BioLegend) were added and the cells were incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. After that, cells were washed with PBS and analyzed by flow cytometry.

2.7 Immunofluorescence reactions for cytokine labeling

Immunofluorescence reactions for cytometric analysis were performed as described by Souza et al. [14]. For phenotypic labeling of monocytes, after centrifugation (eight minutes, 200 g, 4°C), solution containing anti-CD14 monoclonal antibody (clone M5E2, BioLegend) was diluted in 0.015M PBS, pH 7.4, containing 0.01% azide and 0.2% bovine serum albumin (BSA). After incubation for 15 minutes at 4°C, the cells were washed with PBS and fixed with a 2% formaldehyde solution in PBS, for 20 minutes at room temperature. For intracytoplasmic labeling, cells were permeabilized with 0.5% saponin for 10 minutes and then incubated with anti-IL-1 α monoclonal antibodies (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. Cells were washed twice with saponin solution, resuspended in

PBS and analyzed on a flow cytometer (FACSCanto [™] II, Becton Dickinson, New Jersey, USA).

2.8 Cytometric analysis

About 70,000 cells were evaluated for each analysis. The cytometric data were analyzed using FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc., USA). For cytokine analysis, populations of CD14-positive monocytic cells were selected from the granulation graphs (Fig. 1). Percentages of cells expressing each of the cytokines evaluated within the CD14 + monocyte population were then determined (Fig. 2). The percentages of viable cells (Annexin-7-AAD-), early apoptotic cells (Annexin + 7-AAD-), and late stage apoptotic or necrotic cells (Annexin + 7-AAD +) were determined in the total population of PBMC and in the CD14 + monocyte population.

2.9 Statistical analysis

The Kolmogorov-smirnov normality test showed a normal distribution of the data. To verify the existence of differences between the groups in both cell viability analysis and cytokine expression, the ANOVA test was employed using a criterion with repetition, followed by Tukey's post hoc test for comparison between pairs, with a significance level of 5%. Analyzes were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3 Results

3.1 Cytotoxicity of adhesive systems

The MTT assay showed that all adhesive systems in the dilutions tested were able to reduce the viability of PBMC compared to Control after 20 hours of incubation

(Fig. 3). Comparison between the adhesive systems show, at 1: 2 dilution, that CSEB significantly reduced cell viability compared to SBU (Fig. 3). However, in 1: 3 dilution, no significant differences were observed between the systems.

3.2 Effect of adhesive systems on apoptosis

To verify if the reduction of cell viability caused by the adhesive systems was due to apoptosis, PBMCs were stimulated or not with *S. mutans* and incubated with a supernatant of the adhesive systems, at the 1:3 dilution and were labeled with Annexin V and 7-AAD. Cytometric analysis showed that the addition of supernatant from the adhesive systems did not significantly affect the percentage of apoptotic cells in relation to the control in the total PBMC population (Fig. 4). The Sm-CSEB group had a higher percentage of late stage apoptotic or necrotic cells when compared to Control and Sm groups in the total PBMC population (Fig. 4E). Regarding the cellular viability of PBMC, the Sm-CSEB group exhibited lower percentages of viable cells when compared to Control, Sm and Sm-SBU groups.

Analysis of the CD14 + monocyte population showed no significant differences in the percentage of viable cells (Fig. 4B), early apoptotic cells (Fig. 4D) or late stage apoptotic or necrotic cells (Fig. 4F) between the different experimental groups. The mean percentages of early apoptotic cells ranged from 1.77% to 4.35% and mean percentages of late stage apoptotic or necrotic cells ranged from 4.44% to 8.69% in the CD14 + monocyte population.

3.3 Effect of adhesive systems on the production of cytokines by monocytes

Incubation of PBMC with supernatants from SBU or CSEB adhesive systems did not affect the frequency of producing monocytes of IL-1 α , IL-6, IL12 and TNF

(Fig. 5). However, SBU significantly reduced the frequency of IL-10 producing monocytes (Fig. 5D) and increased IL-8 producing monocytes relative to Control (Fig. 5C). The SBU-induced increase in IL-8⁺ monocytes was statistically similar to that observed in the *S. mutans*-stimulated group (Fig. 5C). In addition, by comparing the adhesive systems, the SBU group exhibited significantly higher percentages of IL-8⁺ monocytes than the CSEB group (Fig. 5C).

The incubation of PBMC for eight hours with *S. mutans* caused a significant increase in the frequency of cytokines producing IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α (Fig. 5). In *S. mutans*-stimulated cells, the addition of CSEB supernatant (Sm-CSEB) reduced monocyte frequencies producing IL-6 (Fig. 5B) and TNF- α (Fig. 5F), while the addition of SBU increased the frequencies of IL-8-producing monocytes (Fig. 5C). Comparing adhesive systems in the presence of *S. mutans*, there was no significant difference in the frequency of IL-1 α , IL-10 and IL-12 positive monocytes between the Sm-SBU and Sm-CSEB groups. However, the frequencies of monocytes producing IL-6 and TNF- α were significantly lower in the Sm-CSEB group than in the Sm-SBU group (Fig. 5B and 5F). In addition, Sm-SBU exhibited significantly higher percentages of IL-8 producing monocytes when compared to Sm-CSEB (Fig. 5C).

Cytometric analysis showed that incubation with *S. mutans* for eight hours was not able to significantly increase the frequency of IL-10 producing monocytes (Fig. 5D). Regardless of incubation with bacteria or supernatants from the adhesive systems, the frequencies of IL-10 producing monocytes were very low. Incubation with *S. mutans* and supernatants of SBU and CSEB also significantly reduced the percentages of IL-10⁺ monocytes relative to the Control group (Fig. 5D).

4 Discussion

Resin adhesive systems have molecules of low molecular weight monomers such as HEMA and TEGDMA, which can cause specific toxic effects on pulp cells due to their high diffusion capacity by dentin [6,15,16]. It has been demonstrated that HEMA, an extremely common component in adhesive systems, reduces the mitochondrial activity of fibroblasts [6]. Due to anatomical and physiological factors, pulp tissue is limited in combating bacterial invasion or even in response to a damaging stimulus [17]. Dawson et al. [18], in a systematic review of the literature, showed, through six studies, an incidence of 2 to 12% of pulpal changes in teeth treated by composite resin restorations [18]. In addition to the immuno-inflammatory response caused by caries bacteria, resinous adhesive systems are also capable of inducing microscopic changes in the pulp of human teeth with moderate inflammatory infiltrate [13]. The resin monomers continue to penetrate the tubular dentin until three days after the application of the adhesive systems [16].

In the present study, we evaluated the cytotoxic effect of products released by contemporary adhesive systems on the viability of human PBMC. The MTT assay showed that both adhesive systems, SBU and CSEB, significantly reduced cell viability at the dilutions tested and that CSEB showed dose-dependent effect. Cytotoxicity of different adhesive systems has also been demonstrated in mouse odontoblastic cells, ranging from different brands [19]. Our results showed that CSEB at 1: 2 dilution was significantly more cytotoxic than SBU for human PBMC. Because it is a two-step system, CSEB may contain more toxic reactive components and its acidic character to achieve adhesion may contribute to its cytotoxicity. SBU, all-in-one, has all chemical compounds in a single vial, which are polymerized together, possibly causing less of a release of substances into the medium. Furthermore, while

CSEB has a large amount of water in the solvent, which may hinder its evaporation, SBU has other more volatile solvents, facilitating polymerization and reducing the release of products and the possibility of adhesion failures [20].

To verify if the reduction in cell viability caused by the adhesive systems was due to the induction of apoptosis, the cells were immunolabelled to annexin V. Our data showed that although adhesive systems alone did not affect cell death, the addition of CSEB to PBMCs stimulated with *S. mutans* reduced cell viability and significantly increased percentages of late stage apoptotic or necrotic cells. These data suggest that immunocompetent cells activated by cariogenic bacterial products are more sensitive to the cytotoxic effects of induction of death by the products released from the CSEB. Considering that adhesive systems are frequently used in teeth with pulpal inflammation, either by carious lesions or by bacterial infiltration in inadequate restorations, their released products may affect immunoblotting mechanisms related to microbial combat. Interestingly, these cytotoxic effects were not observed in the CD14 + monocyte population, suggesting that other leukocyte types are more susceptible to the action of the products released by the adhesive systems.

In the present study, for the cytometric analysis, the 1:3 dilution of the supernatants of the adhesive systems was chosen, which induced a smaller reduction of cell viability without a significant difference between the adhesives. The objective of this strategy was to verify the effect of adhesive systems on the production of cytokines by monocytes with the lowest influence of cell death.

Our results showed that only the addition of SBU was able to significantly alter the cytokine profile, increasing the frequency of IL-8 producing monocytes and reducing the frequency of IL-10 producing monocytes. Additionally, SBU induced IL-8

production similarly to *S. mutans* stimulation, demonstrating inflammatory induction of neutrophil recruitment. The cytokine IL-8 is produced by a variety of cells, such as mononuclear phagocytes and dendritic cells, in the early stages of inflammation and has the function of stimulating the expression of vascular endothelial adhesion molecules and the recruitment of neutrophils into the extravascular tissues [21]. In addition, it is able to activate neutrophils and stimulate the release of microbicidal enzymes [21]. On the other hand, the cytokine IL-10, produced mainly by activated macrophages, has anti-inflammatory functions that act as a negative feedback regulator. It inhibits angiogenesis and the production of proinflammatory cytokines such as TNF- α , and the expression of costimulatory surface molecules, disabling macrophages and lymphocytes [11]. In addition, IL-10 acts to terminate the responses activated by other cytokines and allows a return to homeostasis at the end of the microbial infection [22]. Our data suggest that substances released from SBU can affect the balance of pro and anti-inflammatory cytokines, contributing to the stimulation of an acute inflammatory process in the pulp tissue of restored teeth, which is related to painful symptomatology and, in the most intense cases, with necrosis of the pulp.

In an attempt to approach in vivo pulp conditions, where most of the teeth are to be restored by composite resin present carious lesion or bacterial infiltration in the restoration, the PBMC were stimulated by *S. mutans* prior to incubation with the supernatants of the adhesive systems.

S. mutans is the main bacterium responsible for the onset of the carious lesion [10]. It has several surface molecules that can act as virulence factors, allowing its adhesion to the saliva film in the teeth, accumulation in dental biofilm, acid production, invasion of dentinal tubules and pulp tissue, interaction with the cells and,

after periapical diffusion, interaction with cells of the periodontal ligament [23]. The lipoteichoic acid (LTA) that can be found in most of its cell wall is considered to be the factor responsible for the adhesion of the bacterium to hydroxyapatite, besides being the molecule stimulating the immune-inflammatory response [24]. The *S. mutans* LTA binds preferentially to type-toll 2 receptors (TLR2), activating the nuclear factor κ B pathway (NF- κ B) that regulates the production of cytokines. This activation promotes the secretion of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-8, TNF- α and IL-12 by immunocompetent cells of the pulp, such as macrophages and dendritic cells [10,23,24]. In addition, LTA of *S. mutans* can induce system complement activation [25] and apoptosis in some cells via caspase-1 [26].

Our results showed that incubation with *S. mutans* significantly increased the frequencies of monocytes producing all proinflammatory cytokines evaluated. The addition of CSEB to *S. mutans*-stimulated cells (Sm-CSEB) significantly reduced the frequency of IL-6 and TNF- α producing monocytes relative to the Sm group and the frequency of IL-8 and TNF- α producing monocytes in relation to the Sm-SBU group. The role of various factors of the host's inflammatory response in pulpitis is well documented [9,27-29]. Among these factors, cytokines directly participate in the control of cellular and vascular reactions that can generate from mild irritation to complete necrosis of pulp tissue [27]. In this context, TNF- α plays an important role in inducing vascular phenomena, such as vasodilation and increased vascular permeability, besides stimulating the expression of adhesion molecules on the endothelial surface and the production of chemotactic factors that together promote intense leukocyte recruitment [28]. Large amounts of TNF- α were found in teeth with irreversible pulpitis and their levels were decreased when inflammation persisted for long periods, suggesting evolution to the pulpal necrosis process [30]. Another study

showed that the induction of pulp lesions in rat was able to gradually increase the number of cells expressing TNF- α until the fourth day, with consequent reduction until the seventh day, suggesting kinetics of irreversible pulp lesion in the teeth of these animals [30]. Macrophages, endothelial cells and fibroblasts in response to cytokines' actions such as IL-1 and TNF- α synthesize the IL-6 cytokine and their production is increased after bacterial challenge in pulps in vivo and in vitro [29]. In pulp tissue, it acts to increase vascular permeability, being involved in the formation of edema, which can cause damage to the pulp due to tissue hypoperfusion due to pressure increase in the interstitium [29]. Another cytokine that has increased levels in inflamed pulp tissues is IL-8 [31]. As already described, this potent pro-inflammatory cytokine acts by recruiting neutrophils, and thus is considered the main acute phase marker of pulpitis [31]. The inhibitory effects of CSEB on the expression of proinflammatory cytokines by monocytes stimulated by *S. mutans* suggest protective potential of the tissue destruction induced by these mediators during the inflammatory pulp process. Although these cytokines are important for the recruitment and stimulation of the microbicidal activity of phagocytes, with a consequent effect on the fight against cariogenic bacteria, monomers such as monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) have been shown to inhibit bacterial growth in infected cavities of dog teeth [32]. Adhesive systems containing polymerized MDPs can inhibit the growth of bacteria, such as *S. mutans* and *Lactobacillus acidophilus*, when in contact with them [33,34]. In addition, one study showed a halo of inhibition of growth of *S. mutans* by the CSEB system similar to that induced by chlorhexidine at 0.12% [35]. Some authors believe that the antimicrobial properties of these adhesive systems may be related to the acidity of their compounds necessary for the demineralization of dentin in self-conditioning

systems [32]. Together, this antimicrobial effect could compensate in part for the reduction of the inflammatory activity caused by the CSEB in the fight against the cariogenic bacteria present in the pulp.

While our results showed a reduction of proinflammatory cytokines caused by the addition of CSEB to *S. mutans* stimulated monocytes, SBU increased the frequency of IL-8 producing monocytes under the same bacterial stimulation conditions (Sm-SBU). These data suggest that a likely additive effect of IL-8 production on microbial stimulation and products released from the SBU system led to an expressive increase in the frequency of IL-8 + monocytes. As previously described, this increase could induce an acute inflammation in the pulp tissues of recently restored decayed teeth, causing a deleterious effect on the pulp, especially in teeth with a more intense inflammatory pulp infiltrate.

Although most cytotoxicity studies of dental resin materials evaluate the effect of resinous monomers alone, in different cell and tissue types, other substances present in adhesives may also affect the production of cytokines. Photo-primers, such as canforoquinone, present in both adhesive systems evaluated in the present study, are able to inhibit the proliferation of pulp cells and induce the release of large amounts of IL-6 and IL-8, as demonstrated in a previous study [36]. This demonstrates the complexity of action of the components of the different adhesive systems used in dental practice. In this sense, the present study presents limitations such as cellular stimulation by only one bacterial species, evaluation of the effects of adhesive systems in only one time, besides the impossibility of adequately mimicking conditions *in vivo*, such as fluid movements through the dentin tubules and permeability dentin. Further studies are needed to assess the clinical relevance of molecular and cellular changes found in this study.

5 Conclusion

Our data suggest that products released from different adhesives systems may interfere in cytokine-mediated immunoinflammatory pulp reaction in the presence and absence of stimulation by cariogenic bacteria. An understanding of the effects of cytokine production in the pulp microenvironment may contribute to the understanding of participation of dental materials in the outcome of the pulpal inflammatory process.

References

- [1] Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, et al. Microtensile bond strength of eleven contemporaray adhesives to dentin. J Adhes Dent. 2001;3(3):237-45.
- [2] Perdigão J. New developments in dental adhesion. Dent Clin North Am. 2007 Apr;51(2):333-57
- [3] Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011 Jan;27(1):1-16.
- [4] 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 Aug;27(8):723-47.
- [5] Aranha AMF, Giro EMA, Hebling J, Lessa FCR, Costa CAS. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative composite resin on odontoblast-like cells. J Appl Oral Sci. 2010 Oct;18(5):461-6.
- [6] Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. J Endod 1996;22(5):244-8, 1996.

- [7] Bergenholz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:467-80.
- [8] 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.
- [9] Jiang Y, Schilder H. An optimal host response to a bacterium may require the interaction of leukocytes and resident host cells. *J Endod* 2002;28(4):279-82.
- [10] Hahn C, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infec Immun* 2000 Dec;68(12):6785-9.
- [11] Romagnani S. Citokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molec Immun* 2002;38(12-13):881-5.
- [12] Opdam NJ, Bronkhorst EM, Loomans BA, Huysmans MC. 12-Year survival of composite vs. amalgam restorations. *J Dent Res.* 2010 Oct;89(10):1063-7.
- [13] Scheffel DL, Sacono NT, Ribeiro AP, Soares DG, Basso FG, Pashley D, et al. Immediate human pulp response to ethanol-wet bonding technique. *J Dent.* 2015 May;43(5):537-45.
- [14] 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.
- [15] Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC.. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J Oral Rehabil.* 1994 Jul;21(4):475-87.
- [16] Hamid A, Hume WR. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers *in vitro*. *J Oral Rehabil.* 1997 Jan;24(1):20-5.
- [17] 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.

- [18] Dawson VS, Amjad S, Fransson H. Endodontic complications in teeth with vital pulps restored with composite resins: a systematic review. Int Endod J. 2015 Jul;48(7):627-38.
- [19] Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. Cell Biol Toxicol. 2009 Dec;25(6):533-43.
- [20] Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. Biomaterials. 2007 Sep;28(26):3757-85.
- [21] Bikel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. J Periodontol 1993 May;64(5):456-60.
- [22] 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 Jan;30(9):1665-74.
- [23] Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Ller-Guinard MS et al. Insertional Inactivation of *pac* and *rmlB* 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.
- [24] 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.
- [25] Wang PL, Shirasu S, Daito M, Ohura K. *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid-

induced apoptosis in cultured dental pulp cells from human deciduous teeth.

Biochem Biophys Res Commun. 2001 Mar;281(4):957-61.

- [26] Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Mukai K, Nakanishi T, Matsuo T. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. J Dent Res. 2009 Aug;88(8):762-7.
- [27] Prapanpoch S, Dove SB, Cottone JA. Morphometric analysis of the dental pulp chambers: a method of age determination in humans. Am J Forensic Med Pathol. 1992 Mar;13(1):50-5.
- [28] 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.
- [29] Fargers J, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. Mediat Inflamm. 2015;2015:1-16.
- [30] Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone- resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. Oral Microbiol Immunol. 1995 Aug;10(4):213-9.
- [31] Silva AC, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 Beta and Interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. J Appl Oral Sci. 2009 Sep-Oct;17(5):527-32.
- [32] 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.
- [33] Karanika-Kouma A, Dionysopoulos P, Koliniotou-Koubia E, Kolokotronis A.

Antibacterial properties of dentin bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resins. *J Oral Rehabil.* 2001 Feb;28(2):157-60.

- [34] Amin S, Shetty HK, Varma RK, Amin V, Nair PM. Comparative evaluation of antibacterial activity of total-etch and self-etch adhesive systems: An ex vitro study. *J Conserv Dent.* 2014 May;17(3):266-70.
- [35] Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. *Oper Dent.* 2010 Jul-Aug;35(4):448-53.
- [36] 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.

Legend Figures

Fig. 1. Graph Dotplot granularity versus CD14, showing the population of CD14 + monocytes selected in the Control and S. mutans (Sm) groups.

Fig. 2. Dotplot plot showing the percentage of TNF- α producing cells within the CD14 + monocyte population in the Control and S. mutans (Sm) groups.

Fig. 3. Cell viability assessed by the MTT method of PBMCs exposed to different concentrations of supernatants from adhesive systems. Results expressed as mean percentages of viability in relation to the control group. Error bars indicate standard deviation.

Fig. 4. Percentage of viable cells (Annexin V and 7-AAD double-negative) in the PBMC population (A) and CD14 + (B) monocytes; percentage of early apoptotic cells (Annexin V + 7-AAD-) in the PBMC population (C) and CD14 + (D) monocytes; (A) and CD14 + (F) monocytes in the CMSP (E) population.

Fig. 5. Percentage of cells producing cytokines IL-1 α (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12 (E) and TNF- within the CD14 + monocyte population.

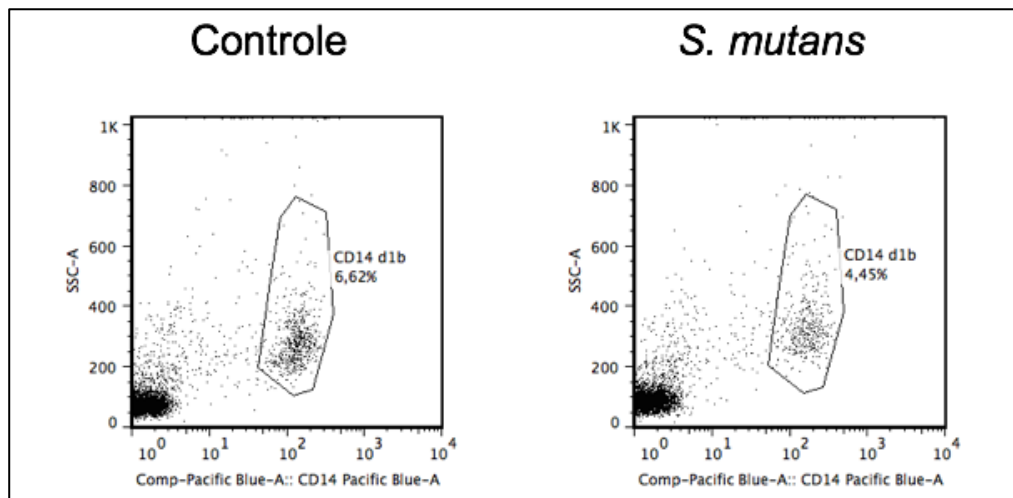
Figures

Fig. 1 - Graph Dotplot granulosity versus CD14, showing the population of CD14 + monocytes selected in the Control and *S. mutans* (Sm) groups.

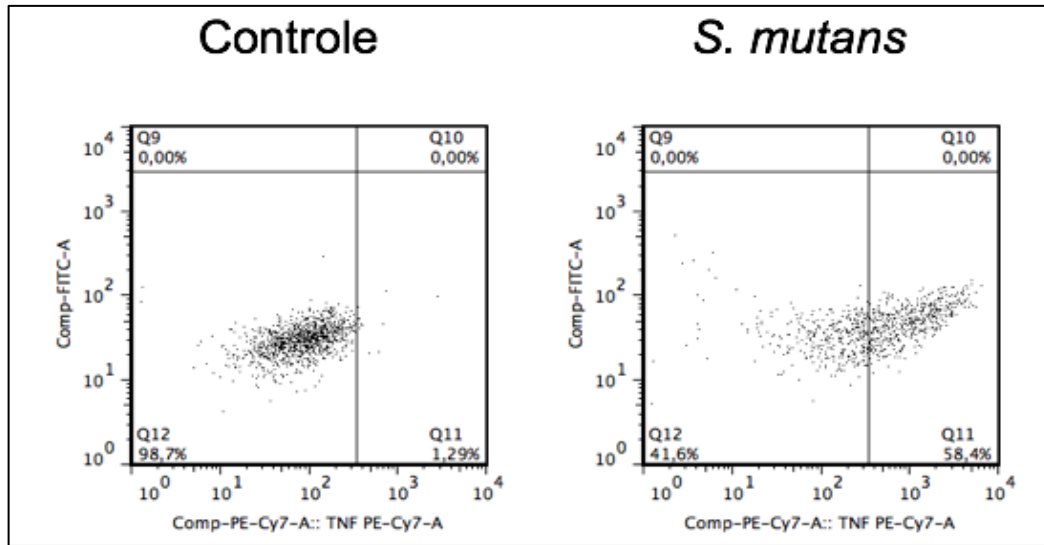


Fig. 2 - Dotplot plot showing the percentage of TNF- α producing cells within the CD14 + monocyte population in the Control and *S. mutans* (Sm) groups.

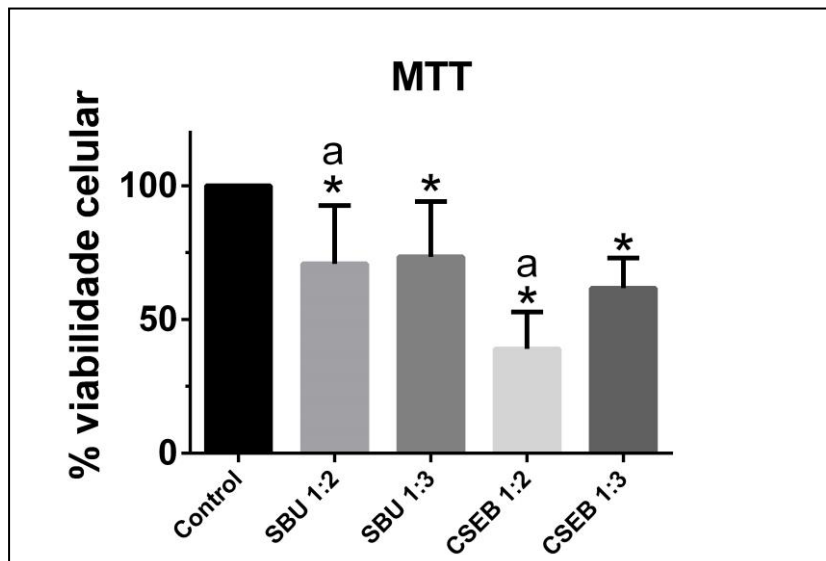


Fig. 3 - Cell viability assessed by the MTT method of PBMCs exposed to different concentrations of supernatants from adhesive systems. Results expressed as mean percentages of viability in relation to the control group. Error bars indicate standard deviation.

*represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to Control and identical letters represent significant differences ($p < 0.05$) between adhesive systems (one-way ANOVA followed by Tukey's test). SBU (Universal SingleBond); CSEB (Clearfil SEBond).

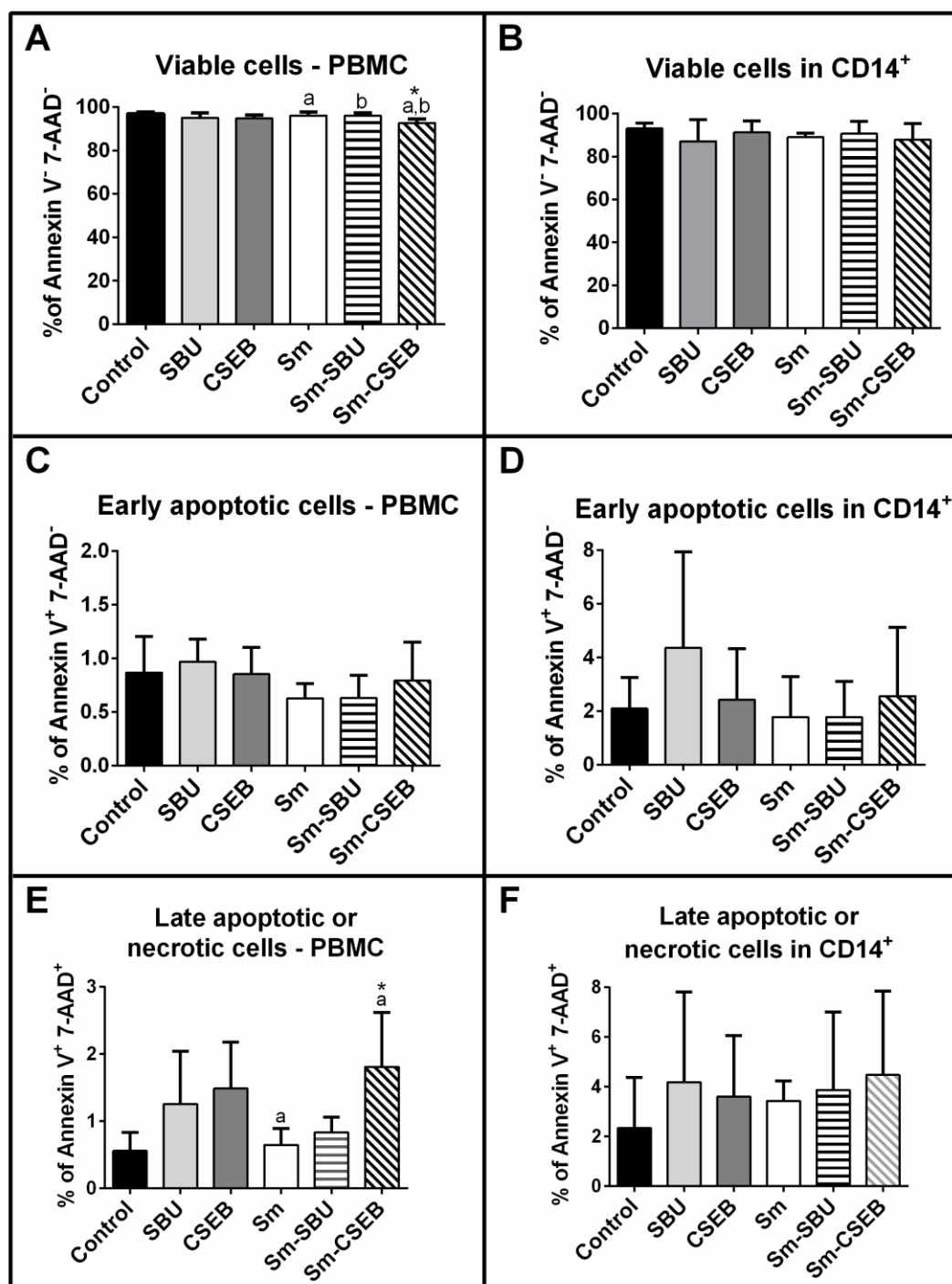


Fig. 4 - Percentage of viable cells (Annexin V and 7-AAD double-negative) in the PBMC population (A) and CD14⁺ (B) monocytes; percentage of early apoptotic cells (Annexin V⁺ 7-AAD⁻) in the PBMC population (C) and CD14⁺ (D) monocytes; (A) and CD14⁺ (F) monocytes in the CMSP (E) population.

*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. SBU (Universal SingleBond); CSEB (Clearfil SEBond); Sm (S. mutans).

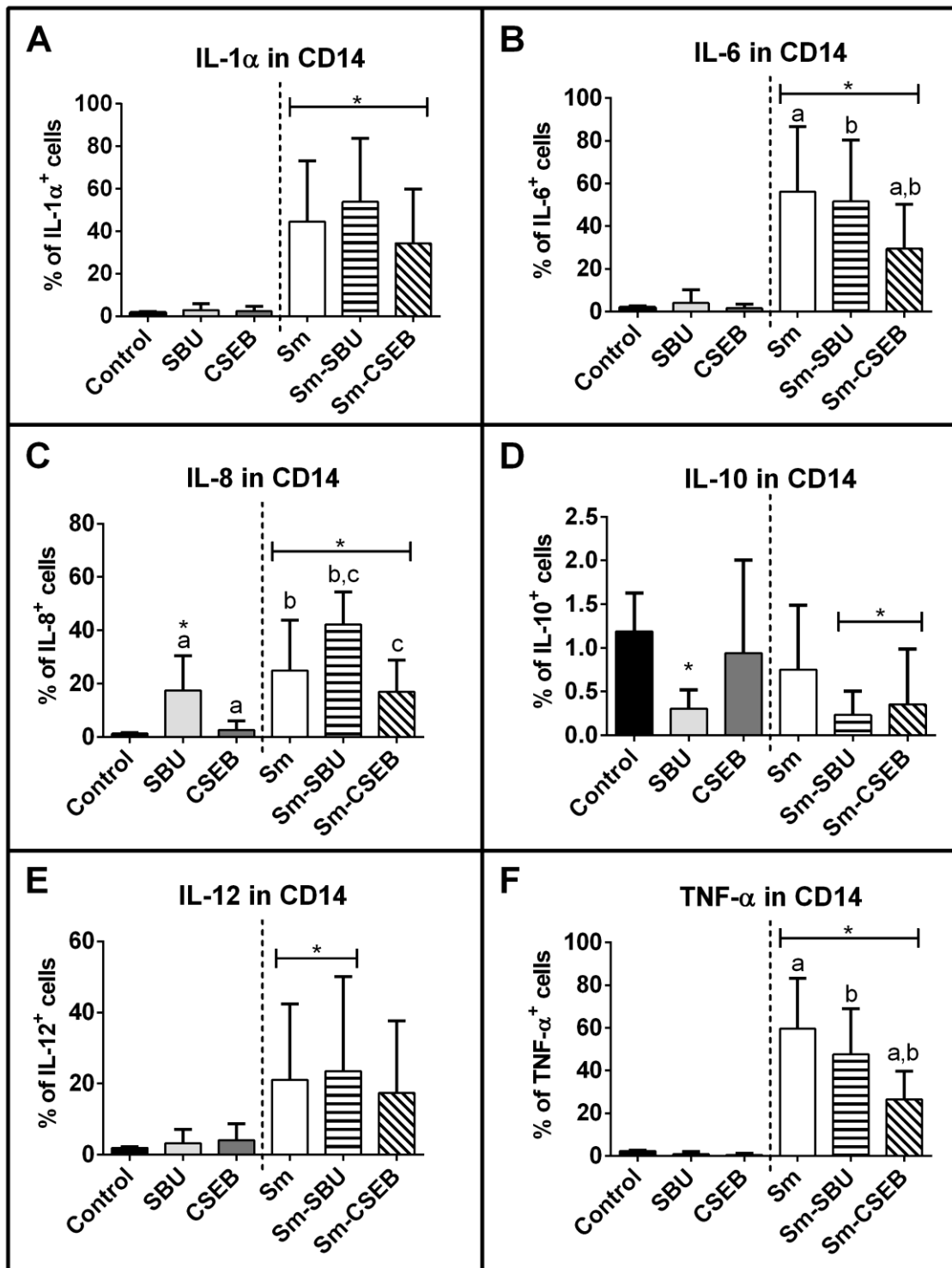


Fig. 5 - Percentage of cells producing cytokines IL-1 α (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12 (E) and TNF- α within the CD14⁺ monocyte population.

*indicates a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control group and identical letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between treatments. One-way ANOVA test followed by the Tukey test. SBU (Universal SingleBond); CSEB (Clearfil SEBond); Sm (Streptococcus mutans).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes sistemas adesivos contemporâneos são capazes de alterar de maneira distinta a produção de citocinas por monócitos humanos estimulados ou não por *S. mutans*. Esses efeitos podem levar a consequências patológicas nos tecidos pulpare, principalmente em dentes com pulpíte decorrente do processo carioso, afetando o curso do processo inflamatório e a capacidade defensiva da polpa, comprometendo sua sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.
- ARANHA, A.M.F. et al. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative composite resin on odontoblast-like cells. **Journal of Applied Oral Science**, v.18, n.5, p. 461-466, 2010.
- ARSLAN, S. et al. Effect of resin infiltration on enamel surface properties and *Streptococcus mutans* adhesion to artificial enamel lesions. **Dental Materials Journal**, v.34, n.1, p. 25-30, 2015.
- ARUNI, A.W. et al. The biofilm community-rebels with a cause. **Current Oral Health Reports**, v.2, n.1, p. 48-56, Mar. 2015.
- 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.
- BARATIERI, L.N.; RITTER, A.V. Four-year clinical evaluation of posterior resin-based composite restoration placed using the total-etch technique. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry: official publication of the American Academy of Esthetic Dentistry**, v.13, n.1, p.50-57, 2001.
- 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.
- BJORNDAL, L.; MJOR, I.A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. 4: Dental caries – Characteristics of lesions and pulpal reaction. **Quintessence International**, v.32, n.9, p. 717-736, Oct. 2001.
- BOUILLAGUET, S.J. et al. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. **Journal of Endodontics**, v.22, n.5, p. 244-248, May 1996
- BOWEN, R.L. Synthesis of a silica-resin direct filling material. Progress report. **Journal of Dental Research**, v.37, p. 90, 1958.
- BUONOCORE, M.G. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. **Journal of Dental Research**, v.34, n.6, p. 849-853, Dec. 1955.
- COCCO, A.R. et al. A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects. **Dental Materials: official publication of the Academy of Dental Materials**, v.31, n.11, p. 1345-1362, 2015.

COSTA, C.A.S. et al. Cytotoxic effects of current dental adhesive system on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. **Dental Materials**, v.15, n.6, p. 434-441, Nov. 1999.

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.

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.

DAWSON, V.S.; AMJAD S.; FRANSSON, H. Endodontic complications in teeth with vital pulps restored with composite resins: a systematic review. **International Endodontic Journal**, v.48, n.7, p. 627-638, July 2015.

EBI, N. et al. Inhibitory effects of resin composite containing bactericide immobilized filler on plaque accumulation. **Dental Materials**, v.17, n.6, p. 485-491, Nov. 2001.

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.

EKLOF, C. et al. Antigen presentation by class II molecule expressing pulp cells. **Journal of Dental Research**, v.72, Spec. Iss, p. 627, 1992.

ENGELS-DEUSTSCH, M. et al. Insertional inactivation of pac and rmlB genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by Streptococcus mutans in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. **Infection and Immunity**, v.71, n.9, p. 5169-5177, Sept. 2003.

FRANKENBERGER, R. et al. Selective enamel etching reconsidered: better than etch-and-rinse and self-etch? **Journal of Adhesive Dentistry**, v.10, n.5, p. 339-344, Oct. 2008.

GAJEWSKI, V.E. et al. Monomers used in resin composites: degree of conversion, mechanical properties and water sorption/solubility. **Brazilian Dental Journal**, v.23, n.5, p. 508-514, 2012.

GATTI, E.; PIERRE, P. Understanding the cell biology of antigen presentation: The dendritic cell contribution. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.4, p. 468-473, 2003.

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

GIANNINI, M. et al. Self-etch adhesive systems: a literature review. **Brazilian Dental Journal**, v.26, n.1, p. 3-10, Jan./Feb. 2015.

GUIDOS, C.; SINHA A.A.; LEE, K.C. Functional differences and complementation between dendritic cells and macrophages in T-cell activation. **Immunology**, v.61, n.3, p. 269-276, July 1987.

GWINNETT, A.J.; TAY, F.R. Early and intermediate response of dental pulp to an acid etch in vivo. **American Journal of Dentistry**, v.10, Spec. No, p. S35-S44, 1998.

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.

HAMID, A.; HUME, W.R. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers *in vitro*. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.24, n.1, p. 20-25, Jan. 1997.

HANKS, C.T. et al. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.21, n.4, p. 475-487, July 1994.

HANSEL, C. et al. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. **Journal of Dental Research**, v.77, n.1, p. 60-67, Jan. 1998.

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.

IMAZATO, S. et al. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. **Journal of Dentistry**, v.28, n.1, p. 61-67, Jan. 2000.

INOUE, S. et al. Microtensile bond strength of eleven contemporaray adhesives to dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v.3, n.3, p. 237-245, 2001.

JIANG, Y.; MAGLI, L.; RUSSO, M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. **Infection and immunity**, v.67, n.5, p. 2125-2130, May 1999.

JIANG, Y.; SCHILDER, H. An optimal host response to a bacterium may require the interaction of leukocytes and resident host cells. **Journal of Endodontics**, v.28, n.4, p. 279-282, Apr. 2002.

JONTELL, M.; BERGENHOLTZ, G. Accessory cells in the immune defense of the dental pulp. **Proceedings of the Finish Dental Society**, v.88, Suppl.1, p. 345-356, 1992.

JONTELL, M. et al. Difference in capacity between macrophages and dendritic cells from rat incisor pulp to provide accessory signals to concanavalin-A-stimulated T-lymphocytes. **Journal of Dental Research**, v.73, n.5, p. 1056-1060, May 1994.

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.

KAWAI, K.; TSUCHITANI, Y. Effects of resin composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.51, p. 123-127, 2000.

KIM, K. et al. The effect of restorative composite resin on cytotoxicity of dentine bonding agents. **Dental Materials**, v.32, n.5, p. 709-717, 2013.

KRZYŚCIAK, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.33, n.4, p. 499-515, Apr. 2014.

LANZA, C.R. et al. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. **Cell Biology and Toxicology**, v.25, n.6, p. 533-543, Nov. 2008.

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.

MJOR, A.I.; FERRARI, M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. **Quintessence International**, v.33, n.1, p. 35-63, Jan. 2002.

NEDELJKOVIC, I. et al. Biofilm-induced changes to the composite surface. **Journal of Dentistry**, v.63, p. 36-43, Aug. 2017.

OHSHIMA, 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.

OPDAM, N.J. et al. 12-Year survival of composite vs. amalgam restorations. **Journal of Dental Research**, v.89, n.10, p. 1063-1067, Oct. 2010.

OZER, F.; BLATZ, M. Self-etch and etch-and-rinse adhesive systems in clinical dentistry. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v.34, n.1, p. 12-18, Jan. 2013

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.

PASHLEY, D.H. et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. **Dental Materials**, v.27, n.1, p. 1-16, Jan. 2011.

PAVLI, P. et al. Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. **Immunology**, v.78, v.1, p. 132-141, Jan. 1993.

PERDIGÃO, J. New developments in dental adhesion. **Dental Clinic North America**, v.51, n.2, p. 333-357, Apr. 2007.

PERDIGÃO, J. et al. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. **Operative Dentistry**, v.39, n.2, p. 113-127, Mar./Apr. 2014.

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

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v.21, n.5, p. 331-344, Oct. 2010.

SCHEFFEL, D.S. et al. Immediate human pulp response to ethanol-wet bonding technique. **Journal of Dentistry**, v.43, n.5, p. 537-545, 2015.

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.

SIMPSON, S.Q.; CASEY, L.C. Role of tumor necrosis factor in sepsis and acute lung injury. **Critical Care Clinics**, v.5, n.1, p. 27-47, Jan. 1989.

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. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Biomaterials**, v.28, n.26, p. 3757-3785, Sept. 2007.

VAN MEERBEEK, B. et al. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. **Operative Dentistry**, v.28, n.3, p. 215-235, 2003.

VARELLA, P.P.; FORTE, W.C.N. Cytokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.24, n.4, p. 146-154, 2001.

WATANABE, I.; NAKABAYASHI, N.; PASHLEY, D.H. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. **Journal of Dental Research**, v.73, n.6, p. 1212-1220, June 1994.

WELLNER, P. et al. Cytokine release from human leukocytes exposed to silorane and methacrylate based dental materials. **Dental Materials**, v.28, n.7, p. 743-748, July 2012.

YOSHIHARA, K. et al. Adhesive interfacial interaction affected by different carbon chain monomers. **Dental Materials**, v.29, n.8, p. 888-897, Aug. 2013.

ANEXO A - Composição dos sistemas adesivos segundo os fabricantes

Tabela: Composição dos sistemas adesivos segundo os fabricantes.

Material	Composição	Lote
SingleBond Universal (3M ESPE)	Frasco Único: BIS-GMA, metacrilato de 2-hidroxieta, MDP, HEMA, sílica tratada com silício, álcool etílico, decametileno dimetacrilato, água, 1,10-decanodiol fosfato metacrilato, copolímero de acrílico e ácido itacônico, Canforoquinona, N,N-dimetilbenzocaína, metacrilato de 2-dimetilamonoetilo, metil etil cetona.	L:#571695
Clearfill SEBond (Kuraray).	Primer: 10-MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, Canforoquinona, água. Agente de união: BIS-GMA, HEMA, 10-MDP, canforoquinona, DHEPT, sílica coloidal.	L:#9N0168

Fonte: Elaborada pelo autor – informações obtidas das instruções dos fabricantes.

ANEXO B – 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: Efeito de sistemas adesivos contemporâneos na produção de citocinas por monócitos e linfócitos humanos estimulados por bactérias cariogênicas

Pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54109216.5.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.827.429

Apresentação do Projeto:

Serão avaliados 3 sistemas adesivos resinosos. Um volume de 10L de cada adesivo ou componente do sistema adesivo (nos casos de primer + adesivo) será aplicado sobre a superfície de uma lamínula de vidro de 15mm de diâmetro. Em seguida, cada sistema adesivo será polimerizado e a tira de poliéster será removida e cada lamínula será colocada em placa de fundo chato. Por meio de punção de veia periférica, serão coletados 20mL de sangue de 20 doadores voluntários saudáveis em tubos contendo heparina. Serão isoladas as células mononucleares de sangue periférico (monócitos e linfócitos) e estas serão incubadas com sobrenadante.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito de substâncias liberadas por diferentes sistemas de adesivos resinosos na viabilidade celular e na produção de citocinas por monócitos e linfócitos estimulados in vitro com *Streptococcus mutans* ou *Lactobacillus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A coleta de sangue será feita por pesquisador com experiência nesse procedimento, 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 minimizado por meio de compressão com dedo no local.

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: 1.827.429

Benefícios: Melhor compreensão sobre o efeito de substâncias liberadas por sistemas adesivos na atividade de importantes células imunocompetentes responsáveis pelo combate a bactérias cariogênicas e seus produtos nos tecidos pulpare.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante.

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_PROJETO_678332.pdf	23/10/2016 22:08:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE54109216.doc	23/10/2016 22:08:08	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisa.docx	13/03/2016 18:14:31	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.docx	11/03/2016 12:00:58	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito

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.proppg@pucminas.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



Continuação do Parecer: 1.827.429

BELO HORIZONTE, 21 de Novembro de 2016

Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador)

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

N.º Registro no CEP: CAAE - 54109216.5.0000.5137

Título do Projeto: Efeito de sistemas adesivos contemporâneos na produção de citocinas por monócitos e linfócitos humanos estimulados por bactérias cariogênicas.

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que estudará o efeito de substâncias liberadas por adesivos utilizados para restaurações de dentes com resinas nas células de defesa que existem no corpo humano. Você foi selecionado porque não está utilizando medicamentos que interferem na resposta imunológica. Para participar desta pesquisa, solicito sua autorização para que os pesquisadores realizem coleta de 20mL de sangue da veia do braço. As células de defesa (leucócitos) presentes no sangue serão expostas aos produtos dos adesivos de resinas odontológicas e avaliadas quanto ao efeito de cada um dos materiais nas funções celulares.

A coleta de sangue será feita por pesquisador com experiência nesse procedimento, 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 minimizado por meio de compressão com dedo no local. A participação nesta pesquisa não trará riscos adicionais a você.

Você não terá nenhum gasto com a sua participação no estudo e também não receberá pagamento pelo mesmo. Sua participação neste estudo é muito importante e voluntária. Você tem o direito de não querer participar ou de sair deste estudo a qualquer momento. As informações obtidas nesse estudo serão confidenciais, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação em todas as fases da pesquisa, e quando da apresentação dos resultados em publicação científica ou educativa, uma vez que os resultados serão sempre apresentados como retrato de um grupo e não de uma pessoa. Você poderá se recusar a participar ou a responder algumas das questões a qualquer momento, não havendo nenhum prejuízo pessoal se esta for a sua decisão.

Todo material coletado durante a pesquisa ficará sob a guarda e responsabilidade do pesquisador responsável pelo período de 5 (cinco) anos e, após esse período, será destruído.

Espera-se que, como resultado deste estudo, você possa contribuir para a elaboração de um trabalho que auxilie os cirurgiões-dentistas a entender o efeito de diferentes adesivos de resinas nas células que atuam na polpa do dente combatendo as bactérias da cárie. Para todos os participantes, em caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa, será observada, nos termos da lei, a responsabilidade civil.

Você receberá uma via deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador responsável, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Nome do pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza (Professor do Departamento de Odontologia da PUC Minas). Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500, prédio 45, sala 110, Coração

Eucarístico, Belo Horizonte, MG, CEP 30535-610. Telefone: 31 3319-4341. E-mail: pauloalencar@pucminas.br

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, coordenado pela Prof.^a Cristiana Leite Carvalho, que poderá ser contatado em caso de questões éticas, pelo telefone 3319-4517 ou e-mail cep.proppg@pucminas.br.

O presente termo será assinado em 02 (duas) vias de igual teor.

Belo Horizonte,

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar deste estudo.

Nome do participante (em letra de forma):

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Eu, Paulo Eduardo Alencar de Souza, comprometo-me a cumprir todas as exigências e responsabilidades a mim conferidas neste termo e agradeço pela sua colaboração e sua confiança.

Assinatura do pesquisador

Data