



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VALÉRIA APARECIDA BELLO

**“ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR, GENOTOXICIDADE
E MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS
DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO-K1) SUBMETIDAS
A TRATAMENTOS COM METACRILATOS E PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO UTILIZADOS NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA”**

Londrina
2015



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

VALÉRIA APARECIDA BELLO

**“ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR, GENOTOXICIDADE
E MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS
DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO-K1) SUBMETIDAS
A TRATAMENTOS COM METACRILATOS E PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO UTILIZADOS NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA”**

VALÉRIA APARECIDA BELLO

**“ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR, GENOTOXICIDADE
E MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS
DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO-K1) SUBMETIDAS
A TRATAMENTOS COM METACRILATOS E PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO UTILIZADOS NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Poli-Frederico

Londrina
2014

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B446a Bello, Valéria Aparecida.

Análise da viabilidade celular, genotoxicidade e modulação da expressão gênica em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) submetidas a tratamentos com metacrilatos e peróxido de hidrogênio utilizados na prática odontológica / Valéria Aparecida Bello. – Londrina, 2014.
124 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Coorientador: Regina Célia Poli-Frederico.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Expressão (Genética) – Teses. 2. Materiais dentários – Citotoxicidade – Teses. 3. Materiais dentários – Genotoxicidade – Teses I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Poli-Frederico, Regina Célia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 575.1

VALÉRIA APARECIDA BELLO

**“ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR, GENOTOXICIDADE E
MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DE OVÁRIO
DE HAMSTER CHINÊS (CHO-K1) SUBMETIDAS A TRATAMENTOS
COM METACRILATOS E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO UTILIZADOS
NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA”**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos
Cólus
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Karen Barros Parron Fernandes
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Dra. Juliana Mara Serpeloni
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dra. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Wagner José Martins Paiva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gisele Maria de Andrade de
Nóbrega
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Hellen Kuasne
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Londrina, 01 de setembro de 2014.

Dedico este trabalho a Deus que, na sua infinita misericórdia, sempre esteve presente.

Aos meus pais que me deram a vida e permitiram que eu chegasse até aqui.

Aos meus filhos, Pedro e João, que são a razão da minha existência.

E, de um modo especial, à minha avó Anna que partiu antes da conclusão desse projeto sem dar tempo para um último adeus.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, que me deu a oportunidade de participar de sua equipe de pesquisa, me ensinando e orientando em todas as fases deste trabalho.

À Profa. Dra. Regina Célia Poli-Frederico, que mais do que minha co-orientadora, foi uma amiga de todas as horas, me apoiando, me ensinando e me aconselhando.

Ao Marcelo Tempesta Oliveira pela importante colaboração nas análises moleculares.

À Heloíza Lizotti Cilião que foi mais do que uma amiga, pois contribuiu imensamente para que este trabalho pudesse ser concluído. Sou muito grata a você por tudo que fez por mim, para mim e comigo nestes anos que passei no laboratório.

Aos companheiros de laboratório: André van Helvoort Lengert, Adeline Limberger, Ana Flávia Leal Specian, Danieli Sartori, Diego Luís Ribeiro, Juliana Mara Serpeloni, Lucas Milanez Benício, Maressa Cristiane Malini de Lima, Marilésia Ferreira de Souza, Milene Nobrega, Rossana Godoy, Vickline Namba, por terem me aceitado como colega de trabalho, pela ajuda e ensinamentos.

Aos professores do curso que contribuíram com mais esta etapa de formação acadêmica.

Aos técnicos Dário e Melissa.

Aos membros da banca examinadora.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Dias coordenadora do curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Aos meus colegas de trabalho da UNOPAR e PUCPR, de modo especial à Sandra Lessa, Valéria Amim, Aline, Eleonora Abba, Juliana Rubira, Paulo Bignardi, José Luiz, José Eduardo Siqueira, Lino Laranjeira e Priscilla Russo.

Aos meus familiares, especialmente meus pais e meus filhos que sempre estiveram comigo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

E especialmente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

MUITO OBRIGADO!

BELLO, Valéria Aparecida. **Análise da viabilidade celular, genotoxicidade e modulação da expressão gênica em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) submetidas a tratamentos com metacrilatos e peróxido de hidrogênio utilizados na prática odontológica.** 2014. 124 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014

RESUMO

O presente trabalho avaliou a toxicidade, genotoxicidade e modulação da expressão gênica dos trietilenoglicol metacrilato (TEGDMA), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEMA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1). No ensaio do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) foram avaliadas concentrações de 1 a 10 mM dos metacrilatos nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas, sendo escolhidas para serem avaliadas nos ensaios subsequentes, as concentrações de 1, 2 e 3 mM para o TEGDMA, 2, 4 e 6 mM para o HEMA e 1, 2 e 4 mM para o TFEMA. Para o H_2O_2 foram testadas concentrações crescentes de 0,5 a 5,5 mM nos tempos de tratamento de 1, 3, 6 e 12 horas. Nos ensaios do cometa e da apoptose/necrose os metacrilatos e o H_2O_2 foram avaliados, respectivamente, nos tempos de 3 e 24 horas de tratamento. As análises de expressão gênica foram realizadas por meio da técnica de RT-qPCR apenas na menor concentração para os metacrilatos e nas concentrações de 1,5 e 2,5 mM para o H_2O_2 . Os dados sem distribuição normal foram analisados por meio dos testes estatísticos Kruskal-Wallis/Dunn e análise de regressão não linear, enquanto que os dados com distribuição normal foram avaliados pelos testes ANOVA/Tukey. Os dados da modulação da expressão gênica foram analisados estatisticamente pelo programa REST. Os resultados obtidos nestes ensaios revelaram que todos os materiais avaliados reduziram a viabilidade celular, sendo que nos tratamentos com metacrilatos este efeito manifestou-se preferencialmente por meio da indução de apoptose em todas as concentrações avaliadas. HEMA, TFEMA e H_2O_2 induziram aumento significativo de células necróticas nas maiores concentrações. O H_2O_2 apresentou severo potencial genotóxico em todas as concentrações testadas, mas os metacrilatos foram genotóxicos apenas nas maiores concentrações. As análises de expressão gênica não permitiram inferir seguramente sobre o envolvimento dos genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L*, *Casp-8*, *Casp-9*, *Ercc1*, *Xpf* e *Top2* na toxicidade dos metacrilatos aqui avaliados. Os metacrilatos modularam negativamente a expressão de alguns genes, TEGDMA modulou os genes *Casp8*, *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L* e *Top2*; HEMA modulou apenas o gene *Tp53* e TFEMA interferiu negativamente no gene *Top2*. Entretanto, o H_2O_2 aumentou significativamente a expressão dos genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L* e *Ercc1*, sugerindo que a toxicidade deste composto seja dependente desses genes. Nossos dados demonstraram que os materiais dentários avaliados apresentaram, nas condições deste estudo, um alto potencial tóxico, sugerindo que a utilização dos mesmos em produtos odontológicos deva ser mais cuidadosa e criteriosa.

Palavras-chave: Células CHO-K1. Monômeros de metacrilatos. Peróxido de hidrogênio. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Expressão gênica.

BELLO, Valéria Aparecida. **Analysis of cell viability, genotoxicity and modulation of gene expression in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) undergoing treatment with hydrogen peroxide and methacrylates used in dental practice.** 2014. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014

ABSTRACT

This study evaluated the toxicity, genotoxicity and modulation of the gene expression of triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate (TFEMA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). In the 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-difeniltetrazóico (MTT) assay were measured concentrations from 1 to 10 mM of the methacrylates in treatment times of 24, 48 and 72 hours, and selected for assessment in subsequent tests, concentrations of 1, 2, and 3 mM to TEGDMA, 2, 4 and 6 mM for HEMA and 1, 2 and 4 mM for TFEMA. For the H₂O₂ were tested concentrations from 0,5 to 5,5 mM in the treatment times of 1, 3, 6 and 12 hours. In Comet and apoptosis/necrosis assays, the methacrylates and the H₂O₂ were evaluated, respectively, in treatment times of 3 and 24 hours. The gene expression analysis were performed by the RT-qPCR technique only in the smallest concentration for methacrylates and in concentrations of 1,5 and 2,5 mM for H₂O₂. The data without normal distribution was analyzed using the statistical tests Kruskal-Wallis/Dunn and non-linear regression analysis, while the data with normal distribution were analyzed using ANOVA/Tukey test. The data modulation of gene expression was analyzed statistically by the REST program. The results obtained in these tests show that all tested materials reduced cell viability, whereas in treatments with the methacrylates this effect expressed preferably via apoptosis induction in all evaluated concentrations. HEMA, TFEMA and H₂O₂ induced significant increase of necrotic cells in higher concentrations. The H₂O₂ showed severe genotoxic potential in all tested concentrations, but the methacrylates were genotoxic only at the highest concentrations. The gene expression analysis did not allow to safely infer about the involvement of the genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L*, *Casp-8*, *Casp-9*, *Ercc1*, *Xpf* and *Top2* in the toxicity of evaluated methacrylates. The methacrylates negatively modulated the expression of some genes, TEGDMA modulated the genes *Casp8*, *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L* and *Top2*; HEMA only modulated the gene *Tp53* and TFEMA affected negatively the gene *Top2*. However, H₂O₂ significantly increased the expression of the genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L* and *Ercc1*, suggesting that the toxicity of this compound is dependent on these genes. Our data demonstrated that the evaluated dental materials presented, under the conditions of this study, a high toxic potential, suggesting that their use in dental products must be more careful and judicious.

Keywords: CHO-K1 cells. Methacrylates monomers. Hydrogen peroxide. Citotoxicity. Genotoxicity. Gene expression.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1:

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR quantitativa em tempo real62

Tabela 2: Valores de IC₅₀ e R² obtidos após tratamento de células CHO-K1 com diferentes concentrações (mM) e em diferentes intervalos de tempo com TEGDMA, HEMA e TFEMA.....63

Tabela 3: Valores de escore e frequência de células com danos no DNA obtidos no ensaio do cometa após 24 horas de tratamento de células CHO-K1 com três concentrações diferentes de TEGDMA, HEMA e TFEMA67

Tabela 4: Frequências absolutas (n) de células apoptóticas e necróticas obtidas para a linhagem celular CHO-K1 após tempo de exposição de 24 horas a 3 diferentes concentrações de TEGDMA, HEMA e TFEM69

Artigo 2:

Tabela 1: Valores de escores e frequências de células com danos no DNA obtidos no ensaio do cometa após 3 horas de tratamento de células CHO-K1 com três concentrações diferentes de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)89

Tabela 2: Frequências absolutas (n) de células apoptóticas e necróticas obtidas em células CHO-K1 após tratamento com 3 diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 3 horas.....90

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- Figura 1:** Estrutura molecular do TEGDMA (trietilenoglicol dimetacrilato).....20
- Figura 2:** Estrutura molecular do HEMA (2-hidroxietil metacrilato).....21
- Figura 3:** Estrutura molecular do 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEMA).....22

Artigo 1

- Figura 1:** Viabilidade das células CHO-K1 obtidas no ensaio do MTT após 24, 48 e 72 horas de exposição a 10 diferentes concentrações de a) TEGDMA, b) HEMA e c) TFEMA66
- Figura 2:** Modulação da expressão gênica em células CHO-K1 expostas a 1 mM de TEGDMA, 2 mM de HEMA e 1 mM de TFEMA por 24 horas70

Artigo 2

- Figura 1:** Viabilidade das células CHO-K1 obtidas no ensaio do MTT após 1, 3, 6 ou 12 horas de exposição a 11 diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).....88
- Figura 2:** Modulação da expressão gênica em células CHO-K1 expostas a 1,5 e 2,5 mM de H₂O₂ por 3 horas91

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Actr5</i>	Gene da proteína homóloga 5 associada a actina ARP5 (<i>ARP5 actin-protein 5 homolog</i>)
<i>Apaf-1</i>	Gene do fator ativador da protease apoptótica 1 (<i>Apoptotic protease-activating of cell death</i>)
BAD	Proteína agonista de morte celular associado à Bcl2 (<i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>)
Bak	Proteína antagonista/assassina Bcl2 (<i>Bcl2-antagonist/killer</i>)
<i>Bax</i>	Gene Bcl-2 associado X (<i>Bcl-2-associated X</i>)
<i>Bcl-2</i>	Gene da proteína do linfoma 2 de célula B (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
<i>Bcl2A1</i>	Gene da proteína A1 relacionado à Bcl-2 (<i>Bcl-2-related protein A1</i>)
<i>Bcl-w</i>	Gene da proteína relacionada à Bcl-2 (<i>Bcl-2-like protein 2</i>)
<i>Bcl-x_L</i>	Gene da proteína do linfoma de célula B extra grande (<i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
BH	Domínio homólogo <i>Bcl-2</i> (<i>Bcl-2 homology</i>)
BID	Proteína agonista de morte que interage com domínio BH3 (<i>BH3 interacting domain death agonist</i>)
BIK	Proteína matadora que interage com Bcl2 (<i>Bcl2-interacting killer</i>)
BIM	Proteína similar à Bcl-2 tipo 11 (<i>Bcl-2-like-11</i>)
BisGMA	Bisfenol A-glicidil metacrilato
BMF	Proteína do fator modificante Bcl2 (<i>Bcl2 modifying fator</i>)
<i>Bok</i>	Proteína matadora ovariana relacionada à Bcl2 (<i>Bcl2-related ovarian killer</i>)
CARD	Domínio de recrutamento de Caspase (<i>Caspase recruitment domain</i>)
<i>Casp8</i>	<i>Gene da caspase-8</i>
<i>Casp9</i>	<i>Gene da caspase-9</i>
cDNA	DNA complementar
cFLIP	Proteína inibidora similar ao FLICE celular (<i>Cellular FLICE-like inhibitory protein</i>)
CHO-K1	Células de ovário de hamster chinês
ciAP-1/2	Proteínas inibidoras celular de apoptose 1/2 (<i>Cellular inhibitor of apoptosis proteins 1/2</i>)

CIV	Cimentos de ionômeros de vidro
CIV-MR	Cimentos de ionômeros de vidro modificados por resina
<i>Cog1</i>	Gene do componente oligomérico do complexo de Golgi tipo 1 (<i>Component of oligomeric golgi complex 1</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPSCs	Células tronco pulpares
DSB	Quebras de fitas duplas de DNA
DSPP	Sialofosfoproteína da dentina
DXR	Doxorrubicina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>Eif3i</i>	Gene do fator eucariótico 3 de iniciação da tradução, subunidade I (<i>Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I</i>)
<i>Erc1</i>	Gene da proteína de reparo de excisão grupo 1 (<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>)
<i>Erc4</i>	Gene da proteína de reparo de excisão grupo 4 (<i>Excision repair cross-complementation group 4</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GMA	Glicidil metacrilato
GSH	Glutathiona
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
<i>Hrip3</i>	Gene da proteína 3 que interage com HIRA (<i>HIRA interacting protein 3</i>)
HKGs	Genes constitutivos (<i>Housekeeping genes</i>)
HO-1	Proteína heme oxigenase-1
HRK	Proteína de morte ou Hataliri tipo 5 (<i>Harakiri ou death protein-5</i>)
LMP – <i>Low melting point</i>	
Mcl-1	Proteína de diferenciação celular da leucemia mieloide induzida (<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation</i>)
MnSOD	Gene da Manganês superóxido dismutase (<i>Manganese superoxide dismutase</i>)

mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
NAC	N-acetilcisteína
NF-kB	Fator de transcrição kappa B
NK	Células matadoras naturais (<i>Natural killer cells</i>)
NMP	<i>Normal melting point</i>
NOXA	Proteína ativadora da NADPH oxidase (<i>NADPH oxidase activator</i>)
OTC	<i>Over-the-counter</i>
PAA	Poli-ácido acrílico
<i>Pabpn1</i>	Gene da proteína ligada a Poli(a), nuclear 1 (<i>Poly(A) binding protein, nuclear 1</i>)
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDTC	Pirrolidina de ditiocarbamato
PUMA	Proteína do componente ligante 3 à Bcl-2 (<i>BCL-2 binding component-3</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SCGE	Eletroforese de célula única (<i>Single cell gel electrophoresis</i>)
TEGDMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
TFEMA	2,2,2-trifluoroetil metacrilato
<i>Top2</i>	Gene da Topoisomerase 2
<i>Tp53</i>	Gene da proteína supressora tumoral p53 (<i>Tumor protein p53</i>)
UDMA	Uretano dimetilmetacrilato
<i>Vezt</i>	Gene da proteína transmembranar de junções aderentes Vezatin (<i>Vezatin, adherens junctions transmembrane protein</i>)
XIAP	Proteína inibidora de apoptose ligada ao fator X (<i>Inhibitor of apoptosis, X-linked</i>)
<i>Xpf</i>	Gene do Xeroderma pigmentoso grupo F (<i>Xeroderma Pigmentosum Grupo F</i>)
<i>Yaf2</i>	Gene do fator 2 associado à YY1 (<i>YY1 associated factor 2</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	MATERIAIS DENTÁRIOS	16
2.2	METACRILATOS E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	20
2.2.1	Utilização na Odontologia	20
2.2.2	Citotoxicidade	24
2.2.3	Genotoxicidade e Modulação da Expressão Gênica	28
2.2.4	Apoptose	34
2.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-QPCR)	40
2.3.1	Genes avaliados no Presente Estudo	42
A	<i>Genes envolvidos na apoptose</i>	43
a.	Gene <i>Casp8</i> (<i>Caspase 8</i>)	43
b.	Gene <i>Casp9</i> (<i>Caspase 9</i>)	44
c.	Gene <i>Bax</i> (<i>Proteína X associada à Bcl-2</i>)	44
d.	Gene <i>Bcl-x_L</i> (<i>Linfoma de células B extra grande</i>)	45
B	Gene <i>Tp53</i> (<i>Proteína de supressão tumoral p53</i>)	46
C	<i>Genes de reparo por excisão de nucleotídeos: Ercc1 (Proteína de reparo de excisão grupo 1) e Xpf (Xeroderma Pigmentosum Grupo F)</i>	47
D	<i>Gene de Replicação do DNA: Top2 (topoisomerase 2)</i>	49
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4	ARTIGO 1 - Metacrilatos como agentes citotóxicos, genotóxicos e moduladores da expressão gênica em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1)	51

5	ARTIGO 2 - Citotoxicidade, genotoxicidade e modulação da expressão gênica induzidos por peróxido de hidrogênio em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1)	78
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXOS	116
	ANEXO A	117
	ANEXO B	119
	ANEXO C	120
	ANEXO D	121

1 INTRODUÇÃO

Os monômeros de metacrilatos trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) e 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) são frequentemente usados, tanto em procedimentos restauradores como estéticos, para produzir polímeros que apresentam excelentes propriedades mecânicas e alta afinidade com os tecidos dentários, especialmente dentina e esmalte. A utilização destes monômeros nos diferentes materiais dentários propicia aumento da aderência aos tecidos dentários, além de permitir redução da viscosidade, melhorando significativamente sua eficácia clínica.

A busca por novas formulações empregando compostos menos tóxicos e mais eficientes tem se tornado bastante frequente na pesquisa odontológica. Neste sentido, alguns estudos revelaram que o 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEMA) possui potencial para ser utilizado na confecção de re-embasadores e na preparação de sistemas adesivos restauradores com metais preciosos, como ouro, prata e paládio.

Graças ao processo incompleto de polimerização dos monômeros, aliado à degradação enzimática e agitação mecânica, os materiais dentários podem promover a contínua liberação de monômeros na cavidade oral, expondo os tecidos orais a estes compostos. A estrutura porosa da dentina permite que os monômeros livres possam alcançar a polpa e cair na corrente sanguínea, se espalhando pelo corpo.

Inúmeros estudos têm revelado que o TEGDMA e o HEMA apresentam potencial citotóxico e genotóxico, afetando a integridade genética e a viabilidade celular. A maioria destes estudos demonstrou que a toxicidade destes monômeros está intimamente associada com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando ao bloqueio do ciclo celular, alterações no metabolismo mitocondrial e à

apoptose. Com relação ao TFEM, até o presente momento não existem dados na literatura sobre possíveis efeitos deletérios associados à sua utilização em materiais dentários.

Além dos procedimentos restauradores, os procedimentos estéticos são também muito valorizados na odontologia contemporânea, sendo que os clareamentos dentários (caseiro ou em consultório) correspondem à metodologia mais procurada. Independentemente da técnica empregada, o clareamento dentário utiliza materiais contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os potenciais efeitos adversos do H_2O_2 sobre os tecidos orais têm sido amplamente investigados, especialmente por ser um agente químico termicamente instável, com um alto potencial oxidativo. Além disso, a liberação de H_2O_2 e sua lenta degradação na saliva proporciona um maior tempo de exposição das células da mucosa oral a altas concentrações deste composto, potencializando assim, seu efeito tóxico.

Finalmente, estudos que avaliem os efeitos tóxicos envolvidos na utilização dos materiais dentários e que permitam um maior esclarecimento dos processos biológicos associados, são de suma importância. Tais estudos podem contribuir, de sobremaneira, para o desenvolvimento de novas formulações que priorizem a biossegurança dos produtos odontológicos comerciais, além de orientar os dentistas para que os mesmos utilizem estes produtos de modo mais criterioso.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS DENTÁRIOS

O principal objetivo da odontologia é preservar e, se possível, melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Para que este fim seja adequadamente alcançado, o dentista deve ficar atento a algumas condutas básicas, como a prevenção de doenças, alívio da dor, melhoria da eficiência mastigatória, aprimoramento da fonética, além dos aspectos estéticos relacionados com a face e a arcada dentária (ANUSAVICE, 2005).

Para que um material dentário seja considerado “ideal” ele precisa apresentar características específicas, como ser biocompatível, possuir adesão permanente às estruturas dentárias e ósseas, ser visualmente semelhante e possuir propriedades similares aos tecidos dentários (especialmente esmalte e dentina) e, finalmente, promover reparação das lesões dentárias (CRAIG; POWERS; WATAHA, 2002).

De acordo com a finalidade do procedimento odontológico, os materiais dentários podem ser classificados em três classes distintas: preventivos, restauradores e auxiliares. Os materiais restauradores são componentes sintéticos que podem ser empregados para reparar ou substituir a estrutura dentária. Nesta classe podemos incluir os agentes adesivos, cimentos, amálgamas, resinas compostas, compômeros, cerâmicas, polímeros para próteses, entre outros (ANUSAVICE, 2005).

Dentre a ampla gama de materiais odontológicos restauradores, as resinas compostas ou compósitos merecem destaque especial, sendo empregadas para substituir os tecidos dentários perdidos nas lesões cariogênicas, além de permitir a modificação da cor e do contorno do dente, contribuindo, deste modo, para a estética facial. Estes materiais dentários são formados por uma matriz de polímero

orgânico (oligômero de diacrilato uretano ou aromático), uma carga de partículas inorgânicas (vidro, quartzo ou sílica), um agente de união (silanos) e um sistema iniciador/acelerador. Os componentes da matriz resinosa são líquidos viscosos, cuja viscosidade deve ser reduzida para um nível compatível com sua aplicação clínica (CRAIG; POWERS, 2006).

O grau de polimerização das resinas compostas também deve ser considerado como uma importante propriedade biológica destes materiais. O processo de polimerização envolvido na síntese dos materiais resinosos se desenvolve na cavidade oral e é quase sempre incompleto, resultando na presença de monômeros livres (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006). Adicionalmente, os monômeros podem ser liberados das restaurações dentárias por agitação mecânica e degradação enzimática dos polímeros e atingir os tecidos da cavidade oral. Graças à estrutura da dentina, onde há inúmeros microcanalículos, os monômeros livres podem alcançar a polpa dentária e, a partir daí, atingir a corrente sanguínea e se espalhar pelo corpo (WISNIEWSKA-JAROSINSKA et al., 2011; SZCZEPANSKA et al., 2012).

Não é uma tarefa muito fácil determinar as concentrações dos monômeros liberados na polpa, no sangue e em outros tecidos do organismo (WISNIEWSKA-JAROSINSKA et al., 2011). Alguns estudos revelaram que estes valores podem variar muito (de microgramas a miligramas), podendo serem encontradas concentrações na polpa de até 8 mmol (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006).

Segundo Van Landuyt et al. (2007), os adesivos dentários correspondem aos materiais dentários empregados na união entre os materiais restauradores e os tecidos dentários (esmalte e dentina). Além de resistir a forças mecânicas e ao

encolhimento do material de revestimento, um bom adesivo também deve ser capaz de prevenir vazamento ao longo das margens da restauração. Clinicamente, a ineficiência das restaurações ocorre com mais frequência devido à vedação inadequada, que devido à perda de retenção.

Outra importante classe de materiais dentários restauradores são os cimentos odontológicos, que podem ser definidos como compostos que, ao se polimerizarem (presa odontológica), adquirem resistência para serem utilizados como uma base sob restaurações, como um agente restaurador em reparações permanentes ou temporárias ou, ainda, como um agente de cimentação (ANUSIVACE, 2005).

Dentre os cimentos odontológicos destacam-se os cimentos de ionômeros de vidro (CIV), amplamente utilizados desde o início dos anos 1970. Devido aos avanços das pesquisas com as resinas odontológicas, uma nova classe de CIV foi desenvolvida – os cimentos de ionômeros de vidro modificados por resina (CIV-MR), resultando em melhorias na capacidade de fixação, bem como nas propriedades mecânicas (BAKOPOULOU et al., 2009a).

A reabilitação oral com próteses totais removíveis também deve ser considerada uma importante área de atuação do dentista. Um dos principais problemas associado ao uso de próteses totais refere-se à redução de sua estabilidade decorrente da reabsorção óssea, o que pode resultar na alteração da dimensão vertical da oclusão, levando à perda de suporte muscular e labial e comprometendo a estética facial do paciente (LANDA et al., 2009). Uma importante estratégia empregada pelos dentistas para minimizar tais efeitos é a utilização de re-embasamento periódico das próteses (EDUARDO, 1997). Os re-embasadores proporcionam estabilidade e retenção às próteses totais e são responsáveis pela

absorção e distribuição de parte da energia gerada pela força da mastigação, diminuindo o impacto pelos tecidos orais (GOYATÁ et al., 2009).

Os materiais de re-embasamento podem ser compostos por resinas acrílicas ou silicone. Os re-embasadores à base de silicone possuem textura porosa, permitindo a retenção de restos de alimentos e a proliferação de fungos, especialmente *Candida albicans* (CRAIG; POWERS, 2006; KASUGA et al., 2008), o que pode levar ao desenvolvimento de estomatite protética (KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLUE, 1997). Já os re-embasadores à base de resinas acrílicas, quando aplicadas diretamente na cavidade oral, podem levar a vários problemas clínicos, tais como odor e sabor desagradáveis e irritação na mucosa oral provocada pelos monômeros contidos nestes materiais (YOSHIDA et al., 2013).

Além dos inúmeros procedimentos restauradores, a dentística contemporânea tem empregado nas últimas décadas diversos procedimentos de cunho predominantemente estético, sendo que o clareamento dentário e o uso de aparelhos ortodônticos são os mais comuns.

Segundo Bortolatto (2011) o clareamento dentário é um dos procedimentos estéticos mais valorizados e procurados pelos pacientes que buscam uma melhora na sua aparência. Este autor afirma que existem duas técnicas básicas de clareamento: a realizada por um profissional no consultório e a caseira, realizada pelo próprio paciente sob supervisão profissional. Ambas as técnicas de clareamento envolvem a aplicação de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre a estrutura dentária.

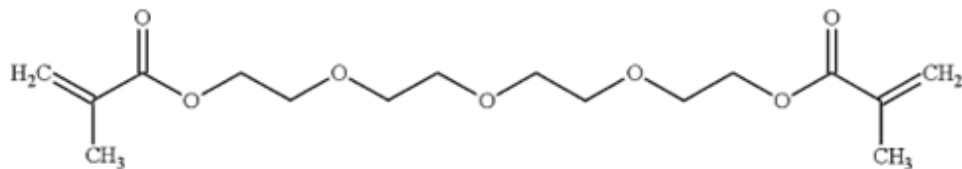
2.2 METACRILATOS E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

2.2.1 Utilização na Odontologia

Na prática odontológica utiliza-se, frequentemente, diversos materiais dentários, como os metacrilatos e o peróxido de hidrogênio, em, respectivamente, tratamentos restauradores e estéticos.

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas, com o objetivo de encontrar novas combinações monoméricas que permitam reduzir a viscosidade das resinas. Um exemplo bastante conhecido e utilizado de resina odontológica multifuncional é a resina Bisfenol A-glicidil metacrilato (BisGMA), descrita como um éster aromático de um dimetacrilato produzido a partir da união entre uma resina epóxi (etileno glicol do bis-fenol A) e o metacrilato de metila. Entretanto, como a viscosidade do BisGMA é muito alta, sua redução é fundamental para que a resina alcance uma consistência compatível com sua aplicação clínica (POWERS; SAKAGUCHI, 2006). Tal redução é obtida pela adição de um monômero diluente – o trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura molecular do TEGDMA (trietilenoglicol dimetacrilato).

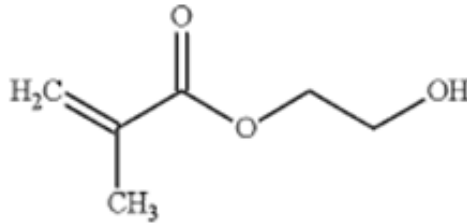


Modificado de Volk et al., 2006.

Outro sistema redutor de viscosidade das resinas compostas, amplamente utilizado nos últimos anos, é o poli(ácido acrílico) (PAA), ao qual foi adicionado o 2-hidroxiethyl metacrilato (HEMA) (Figura 2). O PAA modificado com HEMA é usado nos

cimentos de ionômeros de vidro ativados por luz (ANUSIVACE, 2005). Tanto o TEGDMA como o HEMA são derivados do ácido metacrílico.

Figura 2: Estrutura molecular do HEMA (2-hidroxietil metacrilato).



Modificado de Volk et al., 2006.

Polimetacrilatos podem conter grupos éster hidrolisáveis na sua superfície e a ação de esterases pode liberar produtos de degradação de monômeros para a cavidade oral (SZCZEPANSKA et al., 2012). HEMA é um éster, sendo, portanto, composto passível de degradação por esterases presentes nos fluídos orgânicos (JUNG et al., 2009). Apesar de vários estudos estarem sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar o efeito da degradação enzimática do HEMA, este monômero continua sendo o componente mais encontrado nos materiais restauradores baseados em resina (PARK et al., 2008; KOPPERUD; KLEVEN; WELLENDORF, 2011).

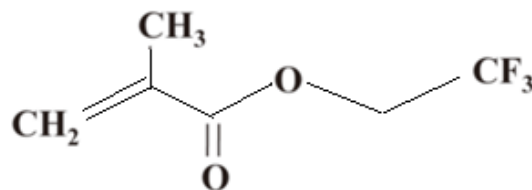
Além das resinas compostas, os monômeros TEGDMA e HEMA são frequentemente encontrados em diferentes materiais odontológicos, como em ionômeros de vidro modificados fotoativados, materiais para selagem e sistemas adesivos (TANAKA et al., 2001; ANUSIVACE, 2005; OLIVEIRA et al., 2012), em concentrações variáveis (de 25 a 55%), dependendo do tipo de material e do fabricante (ANUSIVACE, 2005).

De acordo com Van Landuyt et al. (2007), o monômero HEMA é frequentemente adicionado aos adesivos dentários em virtude de sua forte hidrofília, que lhe confere propriedade semelhante a um solvente, levando a uma melhora na estabilidade das soluções adesivas. Adicionalmente, este monômero também pode ser utilizado como um dos componentes líquidos de resinas acrílicas de reembasamento de próteses dentárias (YOSHIDA et al., 2013).

O dimetacrilato TEGDMA também pode ser encontrado em diversos sistemas adesivos. O uso deste monômero em adesivos dentários baseia-se na sua capacidade de formar ligações cruzadas entre outros monômeros, conferindo um aumento na força mecânica do sistema adesivo. Além disso, o monômero TEGDMA possui caráter hidrofóbico, limitando a absorção de água pelos adesivos (VAN LANDUYT et al., 2007).

Recentemente Kasuga et al. (2008) desenvolveram um novo reembasador macio contendo monômeros fluorados como 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEMA) (Figura 3), assim como avaliaram a influência destes monômeros sobre as propriedades física e de resistência à contaminação. De um modo geral, os autores observaram que a inclusão de monômeros fluorados nos re-embasadores melhorou a maciez dos materiais, além de aumentar sua flexibilidade. Foi observado ainda, que quanto maior o número de átomos de flúor presentes no monômero, melhores foram os resultados obtidos.

Figura 3: Estrutura molecular do 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEMA).



Modificado de Yoshida et al., 2013).

O monômero fluorado TFEMA também vem sendo avaliado quanto à sua aplicação em sistemas adesivos de restaurações com metais preciosos, incluindo ligas áuricas. Kadoma e Tamaki (2009) desenvolveram uma resina adesiva a ligas de metais pesados contendo o monômero TFEM e avaliaram o efeito da fluoração sobre as propriedades desta resina, principalmente com relação à sua resistência à água por longos períodos. Os resultados obtidos pelos autores não foram conclusivos, mas demonstraram a potencialidade deste tipo de monômero na confecção deste tipo de resina adesiva.

O H_2O_2 é um importante material dentário amplamente utilizado tanto no clareamento caseiro como naquele realizado no consultório odontológico. Este composto é um agente oxidante que, por meio do auxílio de ativadores físicos ou químicos (como enzimas, luz ou calor), se dissocia liberando espécies reativas de oxigênio ou EROs (OLIVEIRA et al., 2012), que promoverão o clareamento por meio de reações de oxido redução com moléculas orgânicas presentes na estrutura dentária. O H_2O_2 facilmente penetra nas membranas celulares e gera várias EROs, tais como o radical hidroxila ($\cdot OH$), podendo interferir significativamente na homeostasia celular.

A concentração de H_2O_2 em agentes clareadores pode variar de 3,4 a 6,8% quando o procedimento é realizado pelo próprio paciente em sua residência e chegar a 35% em procedimentos conduzidos pelo dentista em consultório (SLEZAK et al., 2002; WHITE et al., 2002). Em um estudo pioneiro Wattanapayungkul et al. (1999) verificaram que, após uma hora de tratamento utilizando um gel com 10% de peróxido de carbamida, era possível obter na saliva dos pacientes uma concentração de 20 mM de H_2O_2 . Em outro estudo foi verificada uma concentração

máxima de 2 mM de H₂O₂ liberada de um gel contendo 6,5% durante um intervalo de 60 minutos de tratamento (MCMILLAN et al., 2003).

Um dos principais problemas do H₂O₂ é sua lenta degradação na saliva dos pacientes. Hannig et al. (2003) observaram que após 40 minutos de tratamento, apenas 25% do peróxido inicialmente aplicado havia sido degradado. Estes dados indicam que as células da mucosa oral permanecem expostas a altas concentrações de H₂O₂ durante a terapia de clareamento, o que pode levar semanas ou até períodos mais longos de tempo.

2.2.2 Citotoxicidade

A segurança biológica de um compósito polimerizado depende da liberação de seus componentes e da quantidade de material liberado, que pode ser influenciada pelo tipo de material, pelo método restaurador e pelo tipo de polimerização empregados (CRAIG; POWERS, 2006).

Inúmeros estudos revelaram que os monômeros derivados de metacrilatos, como o HEMA e o TEGDMA, podem se difundir através da dentina em concentrações suficientes para causar dano celular (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006; BAKOPOULOU et al., 2009a). Foi verificado que o HEMA liberado dos adesivos dentais pode alcançar concentrações tão altas como 1,5 a 8 mmol/L na polpa (BOUILLAGUET et al., 1996). Do mesmo modo, as concentrações de TEGDMA que atingem a polpa após difusão pela dentina podem alcançar até 4 mmol/L (NODA et al., 2002). Essas concentrações podem ser altas o suficiente para causar efeitos prejudiciais, tais como modificação da resposta inflamatória normal ou homeostase dos tecidos pulpares, incluindo a perturbação do balanço redox celular e distúrbio das vias sensíveis a este balanço (CHANG et al., 2009).

Além dos monômeros de resinas compostas os agentes clareadores, como o H_2O_2 , também podem se difundir através da dentina e alcançar o espaço pulpar, onde podem desencadear importantes respostas inflamatórias (NODA et al., 2003; HUANG et al., 2005; GREGSON et al. 2008). A difusão de diferentes concentrações de H_2O_2 através da dentina também foi avaliada, verificando-se que, em apenas 15 minutos, este composto atravessa toda a espessura da dentina (aproximadamente 0,5 mm), alcançando concentrações capazes de produzir danos biológicos em culturas da linhagem celular de fibroblastos de camundongos (Balb/c 3T3) (HANKS et al., 1993).

Inúmeros materiais e acessórios utilizados na prática odontológica podem causar efeitos adversos em situações clínicas e os mecanismos através dos quais tais reações se desenvolvem ainda não estão totalmente elucidados (VITRAL et al., 2008). Neste sentido, a realização de testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando, principalmente, linhagens celulares permanentes, além de facilitar em muito tais estudos, é fundamental para o início da compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos tóxicos dos materiais odontológicos.

Diferentes parâmetros podem ser utilizados para monitorar os efeitos citotóxicos dos materiais odontológicos, como a inibição do crescimento celular (número de células ou formação de colônias), as modificações na permeabilidade da membrana, alterações na morfologia celular ou do citoesqueleto, modificações na atividade metabólica ou na função celular (JORGE; GIAMPAOLO; PAVARINA, 2004; CRAIG; POWERS, 2006). Entretanto, devido às limitações inerentes à maioria dos testes de citotoxicidade, tais estudos devem, na medida do possível, empregar mais de um método para avaliar quantitativamente a viabilidade celular e, se for o caso, relacioná-la com a citotoxicidade de um composto.

Em sua revisão Schweikl, Spagnuolo e Schmalz (2006) relataram que a maioria das investigações *in vitro* sobre a citotoxicidade dos materiais dentários estão relacionadas à caracterização do padrão de alteração de inúmeros processos celulares, destacando-se os danos à membrana plasmática, inibição da atividade enzimática, inibição da síntese de compostos orgânicos (DNA, RNA e proteínas), ou, simplesmente estimativa do número de células sobreviventes após tratamentos. De qualquer maneira, todos os mecanismos avaliados são indicadores usados para descrever as modificações na função celular básica.

Acredita-se ainda que os componentes dos materiais odontológicos, se aplicados em doses subletais, podem alterar a secreção de citocinas pelos monócitos humanos (HUANG et al., 2005; GREGSON et al., 2008). Do mesmo modo, vários estudos têm demonstrado que tais materiais podem também interferir em outras vias regulatórias do metabolismo celular, como a indução de uma resposta celular ao estresse ou alteração do metabolismo lipídico (NODA et al., 2002; NODA et al., 2003).

O método de exclusão com Azul de Tripán é baseado na capacidade do corante de penetrar apenas em células mortas que tiveram a integridade funcional da sua membrana destruída, enquanto as células viáveis, com membrana intacta, bloqueiam a entrada do corante (RIBEIRO; SALVATORI; MARQUES, 2003). Neste sentido, o método de exclusão com Azul de Tripán apresenta uma importante aplicabilidade, uma vez que avalia a integridade da membrana celular. Entretanto, vale a pena ressaltar que o método permite identificar as células inviáveis que sofreram danos na membrana plasmática, mas não possibilita a distinção de outros tipos de danos que também comprometem a viabilidade celular, tais como lesões no material genético (MCATEER; DAVIS, 1994).

Segundo Sasaki, Nakamura e Kawaguchi (2007), o ensaio de exclusão com Azul de Tripán pode ser efetuado antes da realização de experimentos de genotoxicidade e/ou mutagenicidade com o objetivo de determinar os índices de viabilidade celular após tratamento com drogas potencialmente tóxicas para as células. Estes autores afirmaram que a porcentagem de células viáveis nunca deve ser inferior a 70%, a fim de se evitar interpretações errôneas dos resultados.

Um teste que permite avaliar *in vitro* tanto a proliferação celular como a citotoxicidade de materiais de diversas naturezas sobre células em cultura é o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-il)-2,5-difeniltetrazólico), sendo por este motivo muito utilizado (FORTAKIS; TIMBRELL, 2006). Mosman (1983) descreveu pela primeira vez este teste para avaliar a viabilidade celular baseado no princípio bioquímico do MTT, uma vez que a redução deste composto está diretamente relacionada ao número de células metabolicamente ativas.

O sal de MTT é solúvel em água e pode ser reduzido pela enzima succinato desidrogenase encontrada nas membranas mitocondriais. A redução do sal de MTT pela clivagem do anel tetrazólico resulta na formação de cristais insolúveis de formazan. Como as membranas celulares são impermeáveis aos cristais de formazan, estes se acumulam no interior de células saudáveis (FORTAKIS; TIMBRELL, 2006). A solubilização dos cristais de formazan é obtida por meio da homogeneização dos mesmos com o dimetilsulfóxido (DMSO), resultando na coloração roxa da suspensão celular.

O ensaio do MTT correlaciona, através de espectrofotometria, a quantidade de cristais de formazan produzida com o número de células viáveis presentes em uma amostra. Portanto, a viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT é definida em termos do metabolismo mitocondrial das células, uma vez que a enzima

responsável pela redução do sal de MTT faz parte de uma importante via metabólica das mitocôndrias.

Lee et al. (2006) avaliaram a citotoxicidade de três monômeros (glicidil metacrilato – GMA, HEMA e TEGDMA) por meio do ensaio do MTT em duas linhagens celulares (fibroblastos de pulmão de hamster Chinês – V79-4 e células pulpares clonais de rato – RPC-C2A) e detectaram diferenças nas sensibilidades entre as linhagens, sugerindo que tais variações foram devidas a diferenças inerentes entre as linhagens, como por exemplo, a estabilidade de suas membranas, ou, ainda, a relações entre a estrutura e a toxicidade dos componentes.

No campo da citotoxicidade de materiais odontológicos, o teste do MTT tem sido empregado em inúmeros outros estudos como os de Becher et al. (2006) com GDMA, TEGDMA e HEMA; Min et al. (2008a) e Soares et al. 2014 com peróxido de hidrogênio; Yeh et al. (2009) com 5 diferentes agentes de ligação; Eckhardt et al. (2009) e Mavrogonatos et al. (2010) com TEGDMA; Chang et al. (2010) com UDMA; Bakopoulou et al. (2011) com HEMA e TEGDMA; entre outros.

2.2.3 Genotoxicidade e Modulação da Expressão Gênica

A ação genotóxica dos materiais dentários sobre as células poderia resultar em efeitos mais nocivos do que a morte celular, uma vez que alterações no material genético podem induzir a promoção do crescimento celular e levar à formação de tumores.

O ensaio do cometa, popularmente conhecido como eletroforese de célula única ou SCGE (“*Single cell gel electrophoresis*”), é amplamente utilizado para testes que pretendem avaliar a genotoxicidade de compostos. Este ensaio não permite a detecção de mutações genéticas, mas possibilita a identificação de lesões que

afetam o material genético das células submetidas a tratamento com xenobióticos. Uma vez que tais lesões são passíveis de reparo, o ensaio do cometa, além de avaliar a genotoxicidade de composto, também pode ser empregado em estudos de reparo do DNA (GONTIJO; TICE, 2003).

A técnica do ensaio do cometa foi inicialmente proposta por Ostling e Johanson (1984) e posteriormente modificada por Singh et al. (1988), aumentando a sensibilidade do ensaio. A enorme aplicabilidade deste teste reside na sua capacidade de detectar dois importantes tipos de danos no DNA: as quebras de fitas simples e as quebras de fitas duplas (TICE et al., 2000), além de possibilitar a identificação de sítios álcali-lábeis, sítios de reparo incompletos (RUNDELL et al., 2003). Além disso, o ensaio do cometa é uma técnica rápida, barata e requer um número pequeno de células viáveis para as análises (TICE et al., 2000), não havendo a necessidade de se utilizar células em divisão (MONTEITH; VANSTONE, 1995). A avaliação da genotoxicidade através do ensaio do cometa pode ser aplicada em, praticamente, qualquer tipo de célula eucarionte, em ensaios *in vivo* ou *in vitro* (TICE et al., 2000).

Kleinsasser et al. (2004) avaliaram, em cultura de linfócitos humanos, os efeitos genotóxicos dos metacrilatos HEMA, TEGDMA, BisGMA e UDMA utilizando o teste do cometa. Os autores observaram que, apenas nas maiores concentrações testadas, todos os monômeros foram capazes de induzir um aumento discreto mas significativo da taxa de migração de DNA. Tais resultados sinalizam que a genotoxicidade destes materiais pode ser limitada. Porém, os mais elevados níveis de migração de DNA obtidos neste estudo estavam associados com efeitos citotóxicos também elevados.

Contrariamente, em um outro estudo utilizando culturas primárias de células de glândulas parótidas obtidas por biópsia e linfócitos humanos de sangue periférico, os monômeros TEGDMA, UDMA e HEMA induziram significativo aumento das taxas de migração de DNA no teste do cometa (KLEINSASSER et al., 2006). Segundo os autores os efeitos genotóxicos obtidos sugerem um provável potencial iniciador da tumorigênese dos materiais dentários avaliados, sem descartar a necessidade de uma investigação mais aprofundada.

Blasiak et al. (2012) avaliaram a genotoxicidade de um modelo de adesivo dental contendo dois monômeros, HEMA/BisGMA, e detectaram que estes monômeros também induziram quebras de fitas duplas no DNA e interferiram nos mecanismos de reparo envolvidos neste tipo de dano genético. Segundo os autores as quebras induzidas pelo HEMA/BisGMA podem ter, pelo menos em parte, um caráter oxidativo, visto que o tratamento com agentes antioxidantes, como vitamina C e melatonina, promoveu ação protetora contra os danos induzidos pelos compostos avaliados. Resultados semelhantes foram obtidos em inúmeros outros estudos tais como os realizados com TEGDMA (ECKHARDT et al., 2009; URCAN et al., 2010), HEMA (PAWLOWSKA et al., 2010; URCAN et al., 2010); UDMA e BisGMA (SZCZEPANSKA et al., 2012).

Segundo Mahaney, Meek e Lees-Miller (2009), as quebras de fitas duplas de DNA (*DSB*) podem ser causadas por inúmeros agentes genotóxicos, especialmente as EROs, e são consideradas os tipos mais tóxicos de lesões no material genético. A não reparação de tais lesões resulta em morte celular por apoptose, mas se o reparo for incompleto o resultado será a ocorrência de alterações cromossômicas e consequente instabilidade genômica (POVIRK, 2006).

A genotoxicidade dos agentes clareadores parece estar envolvida na formação de quebras genômicas. Ribeiro, Marques e Salvad (2006) avaliaram o potencial genotóxico de seis diferentes agentes clareadores comerciais utilizando o teste do cometa em células de ovário de hamster Chinês (linhagem CHO-K1). Os resultados obtidos revelaram que tais compostos induzem quebras na molécula de DNA, afetando a integridade do mesmo.

Os mecanismos moleculares que levam às mutações induzidas pelos materiais odontológicos ainda não são totalmente conhecidos. Em sua revisão Schweikl, Spagnuolo e Schmalz (2006) propuseram a existência de pelo menos duas possibilidades para a geração de lesões na molécula de DNA:

- as mutações poderiam ser induzidas pela interação química direta entre os compostos odontológicos e o material genético. Esta interação seria possível graças à afinidade de cargas que ocorreria em centros nucleofílicos do DNA, fornecidas pelas proteínas, bem como pequenas moléculas celulares como a GSH (Glutationa), e levaria à formação de *cross-links* dentro de uma mesma cadeia de DNA.
- os monômeros de resina poderiam induzir mutações por meio de um mecanismo secundário, através do qual ocorreria uma produção aumentada de EROs.

EROs é um termo bastante abrangente que engloba todas as espécies de oxigênio parcialmente reduzidas, denominadas ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^{\bullet}) e óxido nítrico (NO), que, por sua vez pode interagir com $O_2^{\bullet-}$ e gerar ânion peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) (BERRA; MENCK; MASCIO, 2006; OLIVEIRA, 2007), que podem interagir com as principais biomoléculas orgânicas. No entanto, enquanto os lipídeos, os carboidratos e as proteínas podem

ser degradados e posteriormente substituídos, o mesmo não é válido para a molécula de DNA, já que é através dela que toda a informação genética de um indivíduo é armazenada e conservada (SCHWEIKL; SPAGNUOLO; SCHMALZ, 2006).

Uma grande variedade de estudos relacionou a exposição de células e/ou tecidos a monômeros derivados de metacrilato, como o TEGDMA, HEMA, UDMA, BisGMA, com um aumento na produção de EROs (DEMIRCI et al., 2008; SCHWEIKL et al., 2008; ECKHARDT et al. 2009; YEH et al., 2009; CHANG et al., 2010). Tais estudos sugerem fortemente que tanto a citotoxicidade como a genotoxicidade destes materiais estariam diretamente associadas com o estresse oxidativo provocado pelas EROs. Além disso, o aumento da produção de EROs pelos materiais odontológicos pode promover o desencadeamento de respostas celulares que tentam minimizar os efeitos provocados pelas EROs, como por exemplo, o desencadeamento de processo inflamatório (NODA et al., 2003; HUANG et al., 2005; GREGSON et al., 2008).

O envolvimento das EROs na genotoxicidade dos materiais dentários tem sido confirmado através da realização de estudos onde a utilização de agentes antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC), ácido ascórbico, e trolox (vitamina E) reduziram significativamente os danos mediados por TEGDMA e HEMA (WALTHER et al., 2004; SPAGNUOLO et al., 2006; SCHWEIKL et al. 2007). Assim, a atividade clastogênica destes monômeros é, pelo menos em parte, resultado de danos oxidativos no DNA (SCHWEIKL et al., 2007).

Schweikl et al. (2008) avaliaram a genotoxicidade do TEGDMA em culturas de fibroblastos humanos da pele associando a mensuração da produção de EROs e ensaios de bloqueio de ciclo celular com análises do perfil de expressão gênica

através de microarranjos de DNA. Os resultados obtidos neste estudo confirmaram o envolvimento das EROs na genotoxicidade do TEGDMA, pois os testes realizados permitiram verificar que este monômero induziu o aumento da formação de EROs em cerca de 2 a 3 vezes após 1, 2 e 6 h de tratamento. Estes resultados puderam ser confirmados através das análises de expressão, uma vez que a maioria dos genes que tiveram o seu perfil transcricional alterado pelo TEGDMA estão envolvidos em diversos processos relacionados com respostas adaptativas ao estresse oxidativo, como controle da proliferação, crescimento e diferenciação celular, apoptose, reparo e replicação do DNA.

É de suma importância salientar que são ainda escassos dados da literatura que investigam as alterações induzidas pelos materiais odontológicos na expressão dos principais genes envolvidos nas respostas celulares ao estresse oxidativo. Min et al. (2008a) investigaram o efeito do H_2O_2 sobre a expressão de duas proteínas: heme oxigenase-1 (HO-1) e sialofosfoproteína da dentina (DSPP). A HO é uma importante enzima do catabolismo do grupo Heme e possui três isoformas, sendo que a HO-1 é uma proteína de resposta ao estresse e está envolvida em uma variedade de mecanismos protetores e reguladores. Já a DSPP é uma proteína sintetizada pelos odontoblastos e desempenha papel importante na mineralização da dentina durante as reparações. Os autores verificaram que apesar do H_2O_2 reduzir a viabilidade de células da polpa dental, ele promoveu aumento nos níveis de expressão tanto de HO-1 como de DSPP. Segundo os autores, a síntese de HO-1 desempenha um papel protetor contra os efeitos tóxicos do H_2O_2 e estimula a expressão de DSPP, resultando na diferenciação de odontoblastos prematuros. Outros estudos também têm enfatizado a influência dos materiais odontológicos na transcrição de alguns genes envolvidos nos processos celulares nos quais eles

interferem, com destaque especial para os processos inflamatórios (HUANG et al., 2005; CAVIEDES-BUCHELI et al., 2008; CHANG et al. 2009).

2.2.4 Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular, geneticamente controlado, que desempenha um papel crítico no desenvolvimento e funcionamento normal dos organismos multicelulares. Este tipo de morte celular funciona como um mecanismo vital de eliminação de células defeituosas ou desnecessárias, estando envolvida na embriogênese, na manutenção da população celular nos tecidos e órgãos, e auxiliando na homeostasia dos organismos. Um controle rigoroso da apoptose é essencial, uma vez que a morte celular em excesso pode contribuir para o estabelecimento de doenças degenerativas, enquanto que sua escassez está fortemente associada à carcinogênese e doenças autoimunes (CORY; HUANG; ADAMS, 2003).

As células apoptóticas apresentam diferentes modificações morfológicas e inúmeras alterações bioquímicas (KRYSKO et al., 2008). Algumas destas alterações possuem importância sinalizadora para a remoção dos corpos apoptóticos por meio de células vizinhas ou fagócitos especializados. A imediata remoção destes restos celulares impede que mecanismos inflamatórios sejam iniciados, uma vez que não ocorre a liberação de conteúdo celular (ANAZETTI; MELO, 2007; ALBERTS, 2010).

Contrário ao que acontece na apoptose, a necrose envolve o inchaço da célula e sua ruptura após a mesma ter sofrido forte e irreversível injúria. Krysko et al. (2008) descreveram a necrose como sendo resultado de um estresse físico químico, podendo ser induzida por inúmeros fatores como calor, choque osmótico, estresse mecânico, congelamento/descongelamento, hipóxia/anóxia e EROs. Como

consequência da ação direta do estresse provocado por estes fatores, as células iniciam um processo descontrolado de morte celular, onde haverá ruptura da célula e extravasamento de conteúdo citoplasmático, induzindo a uma resposta inflamatória (ALBERTS, 2010).

A maioria das alterações morfológicas observadas durante a apoptose é promovida pela ativação de uma família de proteases chamadas caspases (Proteases aspartato específicas dependente de aspartato ou *Cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) (ADAMS, 2003). Nas células de mamíferos a família das caspases é composta por 15 membros que podem ser agrupados em duas grandes subfamílias, nominalmente conhecidas como caspases inflamatórias e caspases apoptóticas (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2008).

Entre as caspases apoptóticas é possível distinguir dois subgrupos distintos: as caspases iniciadoras e as caspases executoras (ADAMS, 2003; CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2008). As procaspases iniciadoras, caspase-8 e -9 (ADAMS, 2003), apresentam um pró-domínio longo contendo um domínio de recrutamento da caspase (CARD – *caspase recruitment domain*). Este último permite a ligação das procaspases iniciadoras com proteínas adaptadoras, resultando na formação de um complexo de ativação, que ocorre quando a célula recebe um sinal de morte por apoptose. A incorporação das procaspases iniciadoras nos complexos de ativação promove sua aproximação, permitindo sua clivagem e ativação. As caspases iniciadoras ativadas promovem a clivagem e ativação das procaspases executoras, dando início à cascata de caspases. As caspases executoras (-3, -6 e -7) ativam inúmeras proteínas alvo que promoverão diversas alterações na arquitetura morfológica das células apoptóticas (ADAMS, 2003; ALBERTS, 2010).

Outra classe de proteínas que participam ativamente na regulação da apoptose é a família Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) que correspondem a proteínas indutoras ou pró-apoptóticas e proteínas repressoras de morte ou anti-apoptóticas ou pró-sobrevivência (CORY; ADAMS, 2002; BORNER, 2003; CORY; HUANG; ADAMS, 2003; ALFREDSSON et al., 2005). A família Bcl-2 é constituída por três subfamílias (CORY; ADAMS, 2002; ADAMS; CORY, 2007a,b; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008), que apresentam de um a quatro domínios homólogos conservados denominados BH (*BCL-2 Homology*):

1. **Subfamília anti-apoptótica Bcl-2:** compreende proteínas que contêm quatro domínios BH. Esta subfamília inclui as proteínas Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, Bcl2A1 (ADAMS; CORY, 2007a,b; TAYLOR et al., 2008).
2. **Subfamília pró-apoptótica Bax:** inclui as proteínas Bax, Bak e Bok, que apresentam três domínios BH e induzem a apoptose através da formação de poros na membrana mitocondrial externa (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).
3. **Subfamília pro-apoptótica BH3:** corresponde a um grupo muito heterogêneo de proteínas que apresentam apenas um domínio BH conhecido como BH3. Esta subfamília possui pelo menos oito membros (BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA e HRK) que promovem a apoptose quando superexpressos (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

Os membros da subfamília Bcl-2 inibem potencialmente a apoptose em resposta a uma grande variedade de injúrias citotóxicas. Seu domínio hidrofóbico carboxi-terminal contribui para a sua ligação na face citoplasmática de três membranas intracelulares: a membrana mitocondrial externa, a membrana do retículo endoplasmático e a membrana externa do envoltório nuclear. O membro Bcl-2 é uma proteína integral da membrana mitocondrial externa, enquanto Bcl-w e Bcl-

x_L possuem localização citosólica e se associam às membranas celulares logo após sinal citotóxico (CORY; HUANG; ADAMS, 2003). Desta maneira, acredita-se que as proteínas anti-apoptóticas são responsáveis pela manutenção da integridade das membranas celulares, promovendo sua sobrevivência.

As proteínas anti-apoptóticas podem impedir a liberação do citocromo c, uma importante proteína mitocondrial, e a ativação da caspase-9. Elas provavelmente também regulam a ativação de várias outras caspases, independentemente do dano mitocondrial (CORY; ADAMS, 2002). Adicionalmente, a proteína Bcl-2 é capaz de inibir a geração de EROs e a acidificação intracelular, bem como de estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER; THOMPSON, 1999).

Segundo Adams e Cory (2007b), a apoptose induzida por estresse celular requer a ativação de proteínas das duas subfamílias pró-apoptóticas (Bax e BH3). De acordo com estes autores os membros da subfamília BH3 são iniciadores essenciais da apoptose e devem atuar como sensores de danos e bloquear diretamente as proteínas anti-apoptóticas da subfamília Bcl-2. Já as proteínas da subfamília Bax promovem a ativação indireta das caspases através de alterações na permeabilidade das membranas celulares, desestabilizando sua integridade.

As proteínas pró-apoptóticas da subfamília Bax apresentam diferenças na sua localização celular: enquanto Bak está associada às membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático, Bax tem ampla distribuição citosólica (CORY; HUANG; ADAMS, 2003). Entretanto, durante a apoptose as proteínas Bax e Bak sofrem oligomerização na membrana mitocondrial externa, alterando sua permeabilidade e promovendo a liberação de proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo c. A liberação do citocromo c desencadeia a ativação da caspase-9 (CORY; ADAMS, 2002).

A homeostasia tecidual é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos como danos no DNA, levam ao aumento na produção das proteínas pró-apoptóticas, induzindo a apoptose (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004). As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou anti-apoptótico na célula.

A apoptose tem sido amplamente descrita em várias linhagens celulares após exposição a agentes liberados de diversos materiais odontológicos tais como, GDMA, HEMA e TEGDMA (BECHER et al., 2006; LEE et al., 2006); TEGDMA e HEMA (SAMUELSEN et al., 2007); TEGDMA e UDMA (WISNIEWSKA-JAROSINSKA et al., 2011); HEMA (SAMUELSEN et al., 2008; PAWLOWSKA et al., 2010; KRIFKA et al., 2012a; SZCZEPANSKA et al., 2012; SCHWEIKL et al., 2014) e TEGDMA (KRIFKA et al., 2011; KRIFKA et al., 2012b).

Spagnuolo et al. (2004a) estudaram os mecanismos moleculares envolvidos na morte celular induzida por HEMA em fibroblastos humanos de pele. Os autores observaram que este monômero induziu apoptose numa relação dose e tempo-dependente, por meio de uma via envolvendo a das caspases-8, -9 e -3. Neste estudo, foi observado que a apoptose induzida por HEMA não é diretamente dependente da geração de EROs, já que a utilização de um agente antioxidante pirrolidina de ditiocarbamato (PDTC), apesar de reduzir os níveis de EROs, não teve nenhum efeito sobre a apoptose.

Resultados diferentes foram observados por Lee et al. (2006), que verificaram que o aumento de apoptose em células pulpares RPC-C2A expostas a GMA, TEGDMA ou HEMA era significativamente reduzido após o co-tratamento com o

antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Os autores sugeriram que a indução de apoptose por estes materiais nas células empregadas neste estudo estava associada com estresse oxidativo.

A redução antioxidante da apoptose induzida por materiais odontológicos também foi observada por Samuelsen et al. (2007). Neste estudo, os autores observaram que a vitamina C inibiu a formação de EROs e reduziu a apoptose desencadeada por HEMA na linhagem celular da glândula submandibular de ratos (SM 10–12). Entretanto, o mesmo efeito redutor não foi verificado no tratamento com o TEGDMA, sugerindo que a apoptose induzida por este material envolva outros fatores mais importantes do que a formação de EROs.

Schweikl, Spagnuolo e Schmalz (2006) sugerem que a ativação do fator de transcrição kappa B (NF-kB) é o mecanismo celular através do qual a apoptose induzida por monômeros como HEMA poderia ser evitada. Um dos papéis mais importante do NF-kB é a regulação da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como c-IAP-1/2 (Proteínas inibidoras celular de apoptose 1/2), XIAP (proteína inibidora de apoptose ligada ao fator X), cFLIP (proteína inibidora similar ao FLICE celular), Bcl-2 (proteína do linfoma 2 de célula B) e Bcl-x_L (proteína do linfoma de célula B extra grande), bem como de reguladores do ciclo celular – ciclinas D1 e E, que induzem aumento tanto da sobrevivência como da proliferação celular (KARIN; LIN, 2002). Além disso, Djavaheiri-Mergny et al. (2004) demonstraram que a ativação de NF-kB previne a apoptose induzida por estresse oxidativo. Segundo os autores, tal mecanismo provavelmente ocorre em virtude da superexpressão de genes alvo, induzindo aumento nos níveis de tioredoxina e MnSOD (Manganês superóxido dismutase).

Spagnuolo et al. (2004a) observaram que em fibroblastos humanos de pele a ativação de NF- κ B tem efeito protetor contra apoptose induzida por HEMA. Entretanto, o monômero em questão não induz diretamente a ativação de NF- κ B. Segundo estes autores, o mecanismo mais provável de ativação do fator nuclear dependeria da indução de danos celulares por HEMA, os quais seriam os responsáveis diretos por tal ativação.

2.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Os estudos de análises da expressão de genes são de extrema importância no campo da genética, uma vez que propiciam dados relevantes sobre os genes que estão sendo expressos por uma célula em um determinado momento. Tais estudos podem apresentar inúmeras aplicações, desde o entendimento básico do funcionamento de genes de interesse até a validação de estudos genômicos realizados por meio de técnicas moleculares mais elaboradas, como os microarranjos de DNA (BUSTIN; NOLAN, 2004).

Podemos entender a expressão gênica como um termo que mede a quantidade de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) produzidas por uma determinada célula em condições específicas em um determinado tempo (VANGUILDER; URANA; FREEMAN, 2008). Além disso, vale a pena salientar que as variações no nível de síntese dos mRNAs devem refletir possíveis alterações no metabolismo celular e/ou nas condições ambientais às quais as células estão sendo submetidas em um momento biologicamente específico. Neste sentido, a aplicação dos estudos de análises de expressão gênica é de grande valia para as investigações e o entendimento dos possíveis efeitos biológicos de inúmeras drogas.

Entre as mais importantes técnicas empregadas neste tipo de estudo a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) tem sido considerada como uma ferramenta chave da era pós genômica (VANGUILDER; URANA; FREEMAN, 2008). A RT-qPCR é amplamente usada para detectar e quantificar sequências específicas de DNA ou cDNA em diferentes tipos de investigações científicas, desde a biologia fundamental até a biotecnologia, sem deixar de lado as investigações forenses (KARLEN et al., 2007).

A RT-qPCR, diferente da PCR convencional, permite que o padrão de amplificação das amostras possa ser acompanhado, obtendo-se uma medição quantitativa dos produtos de PCR acumulados durante o curso da reação e, por isso, recebeu a denominação de PCR em tempo real (VANGUILDER; URANA; FREEMAN, 2008). A medição dos produtos de PCR é obtida através do monitoramento da fluorescência gerada pela amplificação dos cDNAs, que equivale quantitativamente ao número de cópias de amplicons produzidos a cada ciclo (SKRZYPSKI et al., 2008). A fluorescência é produzida graças à adição de um corante fluorescente à reação, onde o mais utilizado é o Sybr Green, que tem a capacidade de se ligar às moléculas de DNA dupla fita (PFAFFL, 2001).

As análises quantitativas da expressão gênica utilizando a técnica RT-qPCR podem ser realizadas por dois métodos distintos: a quantificação absoluta ou a quantificação relativa. No primeiro método realiza-se a comparação de uma amostra biológica de interesse com uma curva padrão de concentração inicial conhecida (BUSTIN, 2000). Por outro lado, a quantificação relativa determina as mudanças no nível de síntese do mRNA de um gene de interesse comparando com os níveis de síntese do mRNA de um gene de referência, também conhecidos como gene constitutivo ou *housekeeping* (HKGs). Segundo Ohl et al. (2005), nas análises de

quantificação relativa a escolha do gene de referência deve ser extremamente criteriosa a fim de permitir o controle preciso da variabilidade entre as amostras. Para que um gene possa ser escolhido como gene de referência ele deve apresentar os seguintes critérios: ser constitutivo, não ter sua expressão regulada e ter síntese estável nas amostras investigadas. Os genes de referência mais utilizados são o gene da enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), das subunidades de RNA ribossômico 18S e 28S e o gene da beta actina (BUSTIN; NOLAN, 2004).

Bahr et al. (2009) analisaram os perfis transcricionais de uma ampla gama de novos genes HKGs em células CHO-K1 por meio de microarranjos e, posteriormente, foi efetuada a validação usando RT-qPCR. Neste estudo foi selecionado um novo painel de genes *HKGs* específicos para as células CHO-K1, que corresponde a uma importante ferramenta para estudos de análises da expressão gênica nesta linhagem celular.

2.3.1 Genes Avaliados no Presente Estudo

No presente estudo foram realizadas análises da expressão de oito genes envolvidos em diferentes processos biológicos:

- A. Apoptose: *Casp8*, *Casp9*, *Bax* e *Bcl-x_L*.
- B. Supressão tumoral: *Tp53*.
- C. Reparo por excisão de nucleotídeos: *Ercc1*, *Xpf*.
- D. Replicação do DNA: *Top2*.

A Genes envolvidos na apoptose

a. Gene *Casp8* (Caspase 8)

O gene *Casp8* codifica a proteína caspase-8, um importante iniciador que atua no desencadeamento de apoptose por via extrínseca. Sua ativação ocorre por aproximação de moléculas de procaspases-8 e depende, inicialmente, da interação entre um sinal de morte e seu receptor de membrana específico (BOATRIGT; SALVESEN, 2003; WANG; LIU; CUI, 2005). Uma vez ativada, a caspase-8 induz a ativação catalítica das caspases executoras (-3, -6, -7), que promovem a destruição celular por meio da clivagem de centenas de proteínas intracelulares, resultando na apoptose.

A proteína caspase-8 também pode atuar na indução de apoptose por via mitocondrial através da clivagem da proteína BID, um membro da subfamília pró-apoptótica BH3 (GALLUZZI et al., 2012). Neste caso, a caspase-8 induz a formação de uma proteína truncada tBID, que promove a ativação da proteína Bax. Esta última provoca alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial externa, levando à liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas, como o citocromo c (WANG; LIU; CUI, 2005).

Além do seu papel no desencadeamento de apoptose, a caspase-8 também está envolvida no controle da proliferação de células do sistema imune (linfócitos T e B e células NK) e na ativação do fator de transição NF- κ B, que desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imune à infecção (LAMKANFI et al., 2007).

b. Gene *Casp9* (Caspase 9)

O gene *Casp9* codifica a proteína caspase-9, que atua como uma proteína iniciadora da via intrínseca da apoptose. Entretanto, diferente da caspase-8, sua ação está vinculada à liberação de citocromo c pelas mitocôndrias; por este motivo esta via apoptótica também é conhecida como via mitocondrial. No citosol o citocromo c promove a oligomerização de uma proteína adaptadora chamada Apaf-1, o que leva à formação do apoptossomo. Este induz a aproximação e ativação das procaspases-9. A caspase- 9, por sua vez, leva à ativação de procaspases executoras, induzindo a apoptose (WANG; LIU; CUI, 2005).

c. Gene *Bax* (Proteína X associada à Bcl-2)

O gene *Bax* codifica a proteína Bax, que faz parte de uma importante família de proteínas reguladoras da apoptose, a família Bcl-2 e desempenha um importante papel indutor de apoptose.

Bax é um monômero de ampla localização citosólica, mas durante a apoptose sofre oligomerização e, juntamente com uma outra proteína pró-apoptótica – a Bak, se associa à membrana mitocondrial externa (CORY; HUANG; ADAMS, 2003). Na membrana mitocondrial as proteínas Bax e Bak atuam como canais transportadores que permitem a liberação de citocromo c do espaço intermembranoso mitocondrial para o citosol (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). A liberação do citocromo c desencadeia a ativação da caspase-9 (CORY; ADAMS, 2002).

Além do fundamental papel na indução de apoptose por via mitocondrial, Cory e Adams (2002) sugerem que a proteína Bax também possui potencial funcional em outras localizações celulares, como por exemplo no retículo endoplasmático e envoltório nuclear (ADAMS; CORY, 2007b).

d. Gene *Bcl-x_L* (Linfoma de células B- extra grande)

O gene *Bcl-x_L* codifica uma proteína anti-apoptótica que pertence à família Bcl-2, subfamília anti-apoptótica de mesmo nome (TAYLOR et al., 2008). Apresenta forte homologia com outra importante proteína reguladora da apoptose, a proteína Bcl-2 (CORY; ADAMS, 2002; ADAMS; CORY, 2007a,b; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). A forma inativa da proteína Bcl-x_L possui localização citosólica, mas em resposta a diferentes injúrias citotóxicas, associa-se fortemente à membrana mitocondrial externa, (CORY; ADAMS, 2002, CORY; HUANG; ADAMS, 2003).

A inibição de apoptose promovida pela proteína Bcl-x_L se dá a partir do bloqueio da via mitocondrial (ZHAO et al., 2004). De acordo com Huang et al. (2005), impede a translocação da proteína Bax, uma importante proteína pró-apoptótica, para a membrana mitocondrial externa, diminuindo a liberação de citocromo c e, conseqüentemente, a ativação da proteína iniciadora procaspase 9.

Em virtude da ação anti-apoptótica do gene *Bcl-x_L*, inúmeros estudos associam este gene com o desenvolvimento de neoplasias, podendo atuar como oncogenes (CORY; ADAMS, 2002). Zhao et al. (2004) verificaram que em pacientes portadores de linfoma folicular, o gene em questão apresentava altos níveis de expressão. Poverini e Nör (1999) relataram que o gene *Bcl-x_L* pode ser detectado precocemente em lesões displásicas da mucosa oral de seres humanos e em papilomas induzidos por carcinógenos em um modelo animal de rato. Cory e Adams (2002) também mencionaram a associação deste gene com leucemias mieloide e de células T em ratos.

Outro importante papel biológico que tem sido atribuído à proteína Bcl-x_L é o de influenciar o ciclo celular. Cory, Huang e Adams (2003) relataram que células em

G0 que apresentam superexpressão de Bcl-x_L e de proteínas homólogas (Bcl-2 e Bcl-w) avançam mais lentamente para a fase S do ciclo celular quando estimuladas por fatores de crescimento.

B Gene *Tp53* (Proteína supressora tumoral p53)

O gene *Tp53* (Proteína supressora tumoral p53) é responsável pela síntese da proteína p53 que desempenha fundamental papel na homeostasia celular, sendo classificado como um dos mais importantes supressores tumorais. Esta ação ocorre devido ao fato de que em resposta a danos no DNA, a proteína p53 atua como um forte indutor de reparo e de apoptose, além de atuar no bloqueio do ciclo celular (MIYASHITA; REED, 1995). *Tp53* é conhecido como o gene mais frequentemente mutado em cânceres humanos, sendo encontrado em mais de 50% dos tumores malignos (PIETSCH; HUMBEY; MURPHY, 2006; NACCARATI et al., 2012).

Na ausência de estresse celular, a proteína p53 é mantida em baixas concentrações em estado estacionário e exerce muito pouco, se algum, efeito sobre o destino celular. No entanto, em resposta a vários tipos de estresse, a p53 torna-se ativada, isto é, as concentrações da proteína são elevadas, bem como suas potencialidades bioquímicas aumentadas (OREN, 2003).

A ativação da proteína p53, através de sua estabilização pós-transcricional, pode ser obtida a partir de inúmeros sinais estressantes, incluindo danos ao patrimônio genético celular (RYAN et al., 2001; OREN, 2003; LEVINE; FINLAY; HINDS, 2004), encurtamento de telômeros (RYAN et al., 2001; OREN, 2003), ativação de oncogenes (RYAN et al., 2001; OREN, 2003; PIETSCH; HUMBEY; MURPHY, 2006), estresse genotóxico (PIETSCH; HUMBEY; MURPHY, 2006), hipóxia (RYAN et al., 2001; OREN, 2003; LEVINE; FINLAY; HINDS, 2004; PIETSCH;

HUMBEY; MURPHY, 2006) e perda de sinais de crescimento e sobrevivência celular (RYAN et al., 2001). Uma vez ativada, a proteína p53 é translocada para o núcleo, liga-se a regiões específicas do genoma e promove a transcrição de genes que residem na vizinhança destes sítios. As inúmeras proteínas codificadas pelos genes alvo de p53, contribuem de diferentes maneiras para os efeitos biológicos deste supressor (OREN, 2003). Os resultados da atividade da proteína p53 incluem a apoptose, a inibição da progressão do ciclo celular, senescência, diferenciação, reparo do DNA, inibição da angiogênese e indução de apoptose (RYAN et al., 2001; OREN, 2003; SUZUKI; MATSUBARA, 2011).

Neste sentido, a principal função da proteína p53 é reduzir o risco de transformação maligna em células submetidas à ativação oncogênica por meio de danos ao DNA e estresse genotóxico. Esta ação pode ser desempenhada através da ativação ou repressão de diversos genes envolvidos no controle da apoptose (NACCARATI et al., 2012). A proteína p53 pode induzir a expressão de proteínas que atuam nas duas mais importantes vias apoptóticas, a via mitocondrial e a via mediada por receptores de morte (VOUSDEN, 2000).

C *Reparo por excisão de nucleotídeos: genes Ercc1 (Proteína de reparo por excisão grupo 1) e Xpf (Xeroderma Pigmentosum Grupo F)*

O sistema de reparo por excisão de nucleotídeos é uma importante via de reparo nas células de mamíferos, altamente conservada, que permite a correção de lesões no DNA que podem alterar a estrutura helicoidal da molécula, interferindo nos mecanismos de replicação e transcrição. Esta via inclui 4 etapas básicas: o reconhecimento e marcação específica da área lesada, a formação de um complexo que promove o relaxamento da porção danificada, a excisão do fragmento e,

finalmente, resíntese e estabilização da molécula (MARTIN; HAMILTON; SCHILDER, 2008).

O gene *Ercc1* (*Proteína de reparo de excisão grupo 1*) é responsável pela codificação de uma proteína que desempenha um papel fundamental na via de reparo por excisão de nucleotídeos. A proteína Ercc1 forma um heterodímero com o produto proteico do gene *Xpf* (*Xeroderma pigmentosum grupo F*), também conhecido como *Ercc4* (*Proteína de reparo de excisão grupo 4*) (MARTIN; HAMILTON; SCHILDER, 2008).

O heterodímero Ercc1-Xpf atua como uma endonuclease altamente conservada que desempenha um papel fundamental em várias vias de reparo do DNA, especialmente naquelas envolvidas no reparo de lesões induzidas por raios ultravioleta e ligações cruzadas (“*cross-links*”) intra e inter-cadeias de DNA (TIAN, ET AL., 2004; AHMAD et al., 2008; BESSE et al, 2013). A função primária do heterodímero Ercc1-Xpf é reconhecer e cortar estruturas de DNA fita dupla na extremidade 5' de uma lesão, permitindo a clivagem e eliminação do filamento que contém o dano (BESSE et al, 2013). A incisão realizada por Ercc1-Xpf cria um terminal 3'OH que é utilizado como iniciador para a nova síntese de DNA, substituindo as bases excisadas (AHMAD et al., 2008).

Além da participação bem documentada do heterodímero Ercc1-Xpf nas mais importantes vias de reparo de DNA, Kirschner e Melton (2010) relataram o envolvimento deste complexo proteico nos mecanismos de manutenção de telômeros. Nesta revisão, os autores revelaram que Ercc1-Xpf é capaz de interagir com a proteína de ligação 2 (*telomere binding protein 2* (Trf2). Nas extremidades teloméricas, os dímeros Ercc1-Xpf são necessários para remover os terminais 3' ricos em guanina, quando a função de Trf2 é inibida.

D Replicação do DNA: Gene *Top2* (Topoisomerase 2)

O gene *Top2* codifica a enzima topoisomerase 2, responsável por controlar e alterar os estados topológicos da molécula de DNA, modulando processos celulares críticos como a replicação e a transcrição (LI et al., 1999; CHAMPOUX, 2001). Esta enzima nuclear está envolvida em importantes processos genéticos, tais como a condensação cromossômica, recombinação, separação de cromátides e o alívio do esforço de torção que ocorre durante a transcrição e replicação (CHAMPOUX, 2001). Esta enzima tem a capacidade de promover quebras transitórias em ambas as fitas do DNA, e em seguida reconstituir o duplex de DNA (LODISH et al., 2000).

A enzima topoisomerase 2 é o principal componente de um complexo de proteínas não histonas associado à base dos longos *loops* de DNA presentes durante a replicação (LI et al., 1999). Esse dado confirma que esta enzima possa estar envolvida na remoção de emaranhados ou nós presentes em cromossomos lineares recém replicados (LODISH et al., 2000).

Um estudo pioneiro realizado por Li et al. (1999) demonstrou que a enzima topoisomerase 2 pode ser ativada por diversos xenobióticos, inclusive aqueles envolvidos com a formação de EROs, como o H_2O_2 . Uma vez ativada, a enzima topoisomerase 2 seria responsável pela formação de danos à molécula de DNA através de quebras de fitas duplas. Tais danos desencadeariam a morte da célula por apoptose.

A indução de apoptose pela excisão dos domínios de *loops* de DNA através da ativação da topoisomerase 2 já foi confirmada por SOLOVYAN et al. (2002) e SOLOVYAN (2007). Nestes estudos, os autores observaram em células de neuroblastoma NB-2a, que tanto os estágios iniciais como os tardios da apoptose foram acompanhados pela clivagem de fragmentos de DNA de alto peso molecular induzida pela topoisomerase.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Comparar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e a expressão de oito genes envolvidos em respostas celulares promovidos por quatro materiais odontológicos, utilizando a linhagem celular de ovário de hamster Chinês (CHO-K1).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade dos materiais HEMA, TEGDMA, TFEM e peróxido de hidrogênio na linhagem celular CHO-K1;
- Investigar a influência dos materiais odontológicos testados sobre os processos de apoptose e necrose;
- Determinar a interferência dos materiais odontológicos testados na modulação da expressão de genes relacionados com a apoptose (*Casp8*, *Casp9*, *Bax* e *Bcl-x_L*), supressão tumoral (*Tp53*), replicação (*Top2*) e reparo (*Ercc1* e *Xpf*) do DNA.

4 ARTIGO 1

“Metacrilatos como agentes citotóxicos, genotóxicos e moduladores da expressão gênica em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1)”

Artigo a ser submetido ao periódico ***Journal of biomedical materials research part b applied biomaterials***

Fator de impacto: 2.308

“Metacrilatos como agentes citotóxicos, genotóxicos e moduladores da expressão gênica em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1)”

Cilião, HL¹; Bello, VA¹; Oliveira, MT¹; Poli-Frederico, RC²; Cólus, IMS^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina

²Departamento de Odontologia, Universidade Norte do Paraná

*Endereço para correspondência:
Laboratório de Mutagênese e Oncogenética
Departamento de Biologia Geral – CCB
Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário
P.O. Box 10.011, Londrina, Paraná, Brasil.
CEP: 86.057-970
E-mail: ilcecolus@gmail.com
Telefone: 55 43 3371-4608

Resumo

Um dos campos mais promissores da pesquisa odontológica corresponde a busca por novas formulações de materiais dentários que possam aliar maior eficiência e biocompatibilidade. Entre estes estudos destacam-se aqueles realizados com o monômero fluorado 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEMA) na confecção de re-embasadores e sistemas adesivos. Com o intuito de avaliar o potencial tóxico deste composto, o presente trabalho realizou uma análise comparativa sobre a indução de citotoxicidade, genotoxicidade, morte celular e modulação da expressão gênica em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) submetidas a diferentes tempos de tratamento e concentrações de TFEMA, HEMA e TEGDMA. Nossos resultados demonstraram, de forma geral, que todos materiais dentários avaliados apresentaram citotoxicidade dependente da concentração. Apenas o HEMA e o TEGDMA induziram citotoxicidade tempo dependente. Todos os compostos avaliados foram genotóxicos, sendo que apenas o HEMA apresentou genotoxicidade concentração dependente. Todos os materiais induziram apoptose, mas apenas o HEMA e o TFEMA promoveram aumento significativo de necrose nas células CHO-K1. A toxicidade dos monômeros de metacrilatos avaliados neste estudo se manifestou de modo independente da expressão gênica dos genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L*, *Casp-8*, *Casp-9*, *Ercc1*, *Xpf* e *Top2*, visto que nenhum composto foi capaz de promover aumento significativos de transcritos. Deste modo, nossos resultados permitem inferir que o TFEMA apresenta em células CHO-K1 um potencial citotóxico e genotóxico comparável àquele obtidos para o TEGDMA e o HEMA, sugerindo que a utilização deste composto em materiais dentários deve ser realizada com muita cautela.

Palavras chave: 2,2,2-trifluoretil metacrilato, MTT, ensaio do Cometa, apoptose, necrose, RT-qPCR.

INTRODUÇÃO

Monômeros de metacrilato são utilizados em odontologia restauradora e estética para produzir polímeros que exibem excelentes propriedades mecânicas e uma elevada afinidade com o esmalte dos dentes e dentina.¹ Dentre estes monômeros merecem destaque especial o trietilenoglicol-dimetacrilato (TEGDMA) e o 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), que são rotineiramente encontrados na formulação de diversos materiais dentários como cimentos,² agentes de ligação,^{3,4} sistemas adesivos,⁵ compósitos,^{3,6} entre outros. Uma das características mais atraentes destes materiais é sua capacidade de aderência nos tecidos dentários, além de permitir uma redução da viscosidade, melhorando significativamente sua eficácia clínica.⁷

Nos últimos anos, inúmeros estudos revelaram que, de um modo geral, os materiais dentários promovem a liberação dos monômeros constituintes durante ou após sua aplicação nos procedimentos clínicos.^{6,8} O processo de liberação dos monômeros de metacrilato a partir dos materiais resinosos pode ocorrer como consequência da tensão mecânica durante a mastigação,⁹ da degradação enzimática¹⁰ ou da polimerização incompleta dos componentes,^{6,9} podendo durar vários anos.

Os monômeros liberados dos materiais dentários, como o HEMA, TEGDMA, BisGMA e UDMA, entram em contato com os tecidos da mucosa oral e, em função da estrutura porosa da dentina, os monômeros livres podem se difundir para a polpa dentária e atingirem a corrente sanguínea,^{9,12} afetando também outros órgãos, como fígado, cérebro e coração.¹³ Entretanto, é difícil definir a quantidade exata de monômeros que são liberados dos materiais dentários. Estudos revelaram que o HEMA liberado de adesivos odontológicos pode atingir concentrações que variam de 1,5 a 8 mmol/L na polpa dentária, enquanto que as concentrações de TEGDMA podem alcançar valores próximos a 4 mmol/L.¹⁴

Investigações sobre a citotoxicidade dos materiais dentários têm revelado que o TEGDMA e o HEMA apresentam alto potencial para afetar a homeostasia celular, interferindo em diversos processos biológicos importantes, como a proliferação celular,^{9,15,16} apoptose,^{9,17,18} e metabolismo mitocondrial.^{7,19} A maioria destes estudos indicou que a citotoxicidade dos monômeros TEGDMA e HEMA está fortemente associada à depleção de Glutathione (GSH) e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo levar à morte celular por apoptose.²⁰⁻²²

A indução de efeitos genotóxicos por materiais dentários também tem sido amplamente estudada, onde a utilização do ensaio do cometa merece destaque especial. Nos últimos anos, vários estudos empregando diferentes linhagens celulares revelaram que os monômeros TEGDMA e HEMA são capazes de induzir aumento na taxa de migração de DNA resultante da fragmentação do material genético.^{1,9,12} Os efeitos genotóxicos induzidos por estes materiais são, pelo menos em parte, de caráter oxidativo e frequentemente associados com redução da viabilidade celular, indução de apoptose e distúrbios no ciclo celular. Além disso, recentes estudos demonstraram que os danos genéticos induzidos pelo monômero HEMA são passíveis de reparo após 120 minutos do tratamento.^{1,9,17}

Neste sentido a busca por novas formulações de materiais dentários clinicamente mais eficientes e biocompatíveis tem crescido muito nos últimos anos. Entre os estudos realizados nesta área destacam-se aqueles que avaliaram a eficácia da adição do monômero fluorado 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEMA). A utilização do TFEMA na confecção de re-embasadores²⁴ e na preparação de sistemas adesivos restauradores com metais preciosos, como ouro, prata e paládio²⁵, apresentaram resultados promissores. Entretanto, não existem dados na literatura sobre os efeitos biológicos do TFEMA sobre células de mamíferos, uma vez que sua utilização na composição de materiais dentários ainda está na fase inicial de avaliação.

Apesar da ampla gama de trabalhos realizados com TEGDMA e HEMA, existem poucas investigações empregando esses materiais dentários em células de ovário de hamster Chinês (linhagem CHO-K1), considerado um importante sistema biológico de mamíferos, bem estabelecido para análises genotóxicas,¹² citotóxicas²⁶ e de modulação da expressão gênica.²⁷ Além disso, os mecanismos biológicos envolvidos nas citotoxicidade e genotoxicidade do HEMA e TEGDMA ainda permanecem pouco entendidos, por serem os dados disponíveis ainda divergentes. Aliado à escassez de dados na literatura sobre os efeitos adversos do TFEMA, o objetivo do presente estudo foi determinar se o TFEMA é citotóxico e/ou genotóxico para a linhagem celular CHO-K1, além de verificar se este material dentário é capaz de interferir na expressão de genes envolvidos em processos biológicos como apoptose, reparo do DNA e controle do ciclo celular. Os resultados foram comparados com os obtidos também para os monômeros TEGDMA e HEMA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais dentários avaliados

No presente estudo foram avaliados os materiais odontológicos: Trietilenoglicol-dimetacrilato (TEGDMA) (Sigma-Aldrich, CAS N°: 109-16-0); 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) (Sigma-Aldrich, CAS N°: 868-77-9) e 2,2,2-trifluoroetil metacrilato (TFEM) (Sigma-Aldrich, CAS N°: 352-87-4), todos gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Carvalho da Universidade Norte do Paraná (Londrina-PR, Brasil).

Os três materiais dentários foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, CAS N°: 67-68-5), preparando-se uma solução estoque de 1 mol/L de cada um e diluídos em meio de cultura, sendo que as concentrações finais em cultura variaram de 1 a 10 mM, definidas a partir de revisão bibliográfica.^{8,9,16}

O cloridrato de Doxorrubicina (Adriamycin, Sigma-Aldrich, CAS N°: 23214-92-8) na concentração de 0,75 µg/mL foi utilizado como controle positivo para os ensaios de apoptose/necrose e cometa.

Linhagem celular e condições de cultura

Em todas as análises realizadas no presente estudo foi empregada como modelo biológico a linhagem celular de ovário de hamster Chinês (CHO-K1), proveniente da Faculdade de Medicina de Leiden (Holanda) e gentilmente cedida ao nosso laboratório pela Profa. Dra. Sakamoto-Hojo da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP (SP, Brasil).

As células foram mantidas em nitrogênio líquido e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² em meio de cultura Ham-F10 + DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GibcoTM), na proporção 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GibcoTM, CAS N°: 12657-029), 1,2 g/L de bicarbonato de sódio (Reagen, CAS N°: 144-55-8), 0,06 g/L de penicilina G (Sigma-Aldrich, CAS N°: 113-98-4), 0,10 g/L de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, CAS N°: 3810-74-0) e 2,38 g/L de HEPES (Sigma-Aldrich, CAS N°: 7365-45-9). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa BOD (Fanem).

Para a realização dos experimentos foram sempre empregadas culturas que estivessem entre a 3^a. e a 8^a. passagem. As células utilizadas nos experimentos foram subcultivadas sempre que atingiam uma confluência de aproximadamente 80%.

Avaliação de citotoxicidade: ensaio do MTT

O ensaio do Brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (sal do MTT) foi realizado para a linhagem celular CHO-K1 de acordo com o protocolo originalmente descrito por Mosmann,²⁸ com algumas modificações. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (aproximadamente 2×10^4 células por poço em 200 μL de meio completo) por um período de 24 h para estabilização. Após este período as culturas foram submetidas a concentrações crescentes (1 a 10 mM) dos materiais dentários por diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 h). Logo após os tratamentos o meio de cultura foi aspirado e as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) por um período de 4 horas a 37°C. Ao final deste período, a mistura da reação foi cuidadosamente aspirada e foram acrescentados em cada poço 200 μL de DMSO. Após cuidadosa homogeneização da placa, foi efetuada a quantificação da viabilidade celular por meio de espectrofotômetro tipo Elisa (Uniscience) a 550 nm. O tampão PBS foi utilizado em condições idênticas de tratamento, servindo como controle negativo. Os dados foram apresentados como percentual (%) de atividade mitocondrial \pm desvio padrão de sete experimentos independentes na mesma placa.

Protocolo de tratamento para avaliação da genotoxicidade e do índice de apoptose/necrose

Os experimentos com os monômeros de metacrilato foram realizados de maneira independente, empregando os seguintes grupos experimentais: controle negativo (PBS), controle positivo (doxorrubicina) e três concentrações de cada um dos materiais odontológicos testados, escolhidas a partir dos resultados obtidos no ensaio do MTT.

Antes da realização dos tratamentos, as células CHO-K1 foram estabilizadas por 24 h em meio completo. O tempo de tratamento empregado nos experimentos foi de 24 h para todos os materiais testados. Todos os grupos experimentais foram conduzidos em triplicata.

Avaliação de genotoxicidade: ensaio cometa (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE)

O ensaio cometa foi utilizado para quantificar os danos causados pelos materiais dentários à molécula de DNA, conforme metodologia descrita originalmente por Ostling & Johanson²⁹ e modificada por Singh et al.³⁰

Com o intuito de avaliar a viabilidade celular após os tratamentos com os materiais dentários testados, o ensaio de exclusão com azul de Tripan foi realizado em concomitância com o ensaio do cometa. Neste teste, após efetuada a fixação das células, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular de cada tratamento realizado foi homogeneizada com 10 µL de uma solução 0,4% de azul de Tripan (Merck, CAS N°: 72-57-1). A mistura foi transferida para uma câmara de Neubauer e realizada a contagem de 200 células por tratamento, utilizando-se microscópio de luz invertido (Olympus - modelo CKX41) em objetiva de 20 X.

Após a avaliação da viabilidade celular, alíquotas de 20 µL da suspensão celular foram homogeneizadas com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*LMP – low melting point*) 0,5% diluída em PBS. A mistura foi, então, aplicada em lâminas previamente preparadas, contendo uma fina camada de agarose (*NMP-normal melting point*) 1,5% diluída em PBS e cobertas com lamínulas.

Após um período de incubação de 20 minutos a cerca de 4°C, as lamínulas foram removidas e as lâminas submersas em solução de lise de membranas celulares (2,5 M NaCl; 100mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10 mM TRIS, 10% de DMSO, 1% de Triton X, pH 10), onde foram mantidas a cerca de 4°C por um período de 1 hora e 30 minutos.

Depois da lise, as lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese (200 mM EDTA, 10 N NaOH, pH13) por 20 minutos e então submetidas à corrida de eletroforese (25 V, 300 mA) por um período de 20 minutos a 4°C. Em seguida as lâminas foram neutralizadas (TRIS 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, secas e fixadas em álcool etílico absoluto. As lâminas foram conservadas a 4° C até a análise citológica.

Para as análises, as lâminas foram coradas com uma alíquota de 45 µL de solução de GelredTM (Biotium, CAS N°: 76544-02-0) 10.000 X diluído em solução de NaCl 0,1 M para a obtenção de uma concentração final de 30 X e foram analisados 100 nucleoides para cada repetição. Todas as análises foram conduzidas em

microscópio de fluorescência (Nikon) em objetiva de 40 X, com filtro de excitação de 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm.

O método empregado para mensurar o nível de dano genético obtido nos tratamentos foi o visual, com a avaliação do comprimento da cauda formada em relação ao tamanho do nucleóide. Durante as análises os nucleóides foram classificados em 4 classes de cometa (0 a 3), onde a classe 0 correspondia à ausência completa de cauda, e a classe 3 à cauda equivalente ao diâmetro de dois nucleóides.³¹ A frequência de células danificadas foi obtida a partir da somatória do número (n) de células com danos (classes 1 a 3) dividido pelo total de células analisadas.

$$\text{Frequência de células com danos} = \frac{n_1+n_2+n_3}{100}$$

O escore foi calculado de acordo com a fórmula de Manoharan & Barnerjee,³² multiplicando-se o número de nucleóides observados em cada classe, representado na fórmula por n, pelo valor da classe correspondente (0, 1, 2, 3) e dividido pelo total de células analisadas.

$$\text{Escore} = \frac{(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)}{100}$$

Avaliação do índice de Apoptose/Necrose

O protocolo empregado neste ensaio foi baseado naquele descrito originalmente por McGahon et al.,³³ onde todas as condições de tratamento e fixação da suspensão celular foram efetuadas simultaneamente ao ensaio do cometa. Para a realização do teste foi utilizada uma alíquota de 25µL da suspensão celular de cada tratamento, misturada a 1µL da solução de coloração [100 µg/mL de brometo de etídeo (Merck, CAS N°: 1239-45-8) e 100 µg/mL de laranja de acridina (Merck, CAS N°: 65-61-2)]. Em seguida a suspensão celular foi transferida para lâminas de vidro limpas e secas, que foram imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon), em objetiva 40 X, com filtro de excitação 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm.

Foram analisadas 200 células por tratamento, diferenciando-as através da morfologia e coloração em três categorias celulares: células normais, células apoptóticas e células necróticas.

O índice de apoptose/necrose foi obtido empregando-se as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ apoptose} = \frac{\text{número de células apoptóticas}}{\text{total de células analisadas}} \times 100$$

$$\% \text{ necrose} = \frac{\text{número de células necróticas}}{\text{total de células analisadas}} \times 100$$

Avaliação da modulação da expressão gênica: extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa em tempo real.

Após a estabilização de 1×10^5 células da linhagem CHO-K1 cultivadas em placa de 24 poços com 1 mL de meio completo, as culturas foram submetidas aos seguintes tratamentos: Controle negativo (PBS), tratamentos com 1 mM de TFEMA, 1 mM de TEGDMA e 2 mM de HEMA, durante 24 h. Cada experimento foi realizado 3 vezes, com triplicata técnica de cada condição.

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se a extração do RNA total com o reagente TRIzol® (Invitrogen – Life Technologies) em associação com o Kit Pure Link® RNA mini kit (Ambion), segundo as especificações do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA foram determinadas por espectrofotometria (Biophotometer - Eppendorf), levando em consideração para validação amostral a razão de absorbância 260/280 entre 1,7 e 2,0. A integridade do RNA e a presença de contaminação por DNA genômico foi verificada por eletroforese em gel de agarose denaturante 1% segundo Aranda et al.³⁴

O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng do RNA total extraído. O volume final da reação foi de 20 µL, composto por 10% de tampão de reação (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl – Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen), 80 pmol de Oligo dT12-18 (Invitrogen), 100 pmol de Random Primers (Invitrogen), 10 unidades da enzima SuperScript III (Invitrogen) e 2 unidades da enzima RNase Out (Invitrogen). Inicialmente, uma mistura constituída apenas por RNA, Oligo dT12-18, Random Primers e dNTPs foi submetida a uma pré-incubação de 10 minutos a 65° C em termociclador Veriti (Applied Biosystems), seguido de choque térmico em gelo. Uma segunda mistura contendo os demais constituintes foi preparada e adicionada à mistura inicial, totalizando 20 µL. Em sequência, a mistura final obtida foi

submetida ao seguinte programa de reação em termociclador Veriti: 2 minutos a 25° C, 45 minutos a 50° C e 15 minutos a 70° C.

Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa e a possibilidade do efeito Monte Carlo, três reações distintas de síntese de cDNA foram realizadas para cada experimento, cujos produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada amostra em sua respectiva condição de cultivo.

Os dados referentes à expressão gênica foram obtidos pelo emprego da técnica de PCR em tempo real, com a utilização do sistema Techne Quantica Real Time PCR Thermal Cycler (Techne). Para tal, foi utilizado o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante, para um volume final de 20 µL, utilizando 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 250 ng de cDNA molde. A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 95° C por 5 minutos; 40 repetições de ciclos de 15 segundos a 95° C (desnaturação), 15 segundos a 60° C (anelamento) e 30 segundos a 72° C (extensão). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados empregando-se o software Gene Runner versão 3.05 (<http://www.generunner.com>). As sequências dos genes alvo *Casp8*, *Casp9*, *Bax*, *Bcl-xl*, *Tp53*, *Ercc1*, *Xpf* e *Top2* foram obtidas a partir de regiões específicas descritas e depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). A Tabela 1 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes alvo estudados. A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra, assegurando-se de que apenas o produto de interesse fosse amplificado em cada reação, por meio da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 50° C a 98° C em 0,5° C/2 segundos. Os dados foram analisados pelo Quansoft software (Techne). A eficiência de cada primer foi determinada pelo método da curva de diluição.³⁵

Os valores obtidos na situação controle (ausência de tratamento) foram utilizados como referência para comparação, e os cálculos foram normalizados a partir do gene de referência *Yaf2* (Fator 2 associado à YY1) para os tratamentos com HEMA e TFEMA e o gene de referência *Eif3* (Fator eucariótico de iniciação da tradução 3, subunidade I) para os tratamentos com TEGDMA, visto que observamos variações na expressão destes genes. As sequências de ambos os genes foram descritas por Bahr et al.²⁷ Foram considerados apenas valores de Cq (quantification cycle) com uma variação de ± 0,5 entre as triplicatas de reação.

Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados quanto à distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados obtidos no ensaio do MTT não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram analisados estatisticamente utilizando-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis/Dunn e análise de regressão não linear, enquanto que para os dados obtidos no ensaio do cometa, com distribuição normal, foram empregados os testes paramétricos ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores de escore também foram submetidos aos testes de tendência linear e teste t-student não pareado. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio dos Programas GraphPad InStat (versão 3.05 GraphPad Software, Inc.) e GraphPad Prism (versão 6.01), tendo sido estabelecido um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para todos os testes aplicados.

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR quantitativa em tempo real.

Genes	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')
<i>Bax</i>	<i>Forward:</i> gcctcctctcatacttcgg <i>Reverse:</i> cctgtccccattctcccca
<i>Bcl-x_L</i>	<i>Forward:</i> actgtggctggtgtggttc <i>Reverse:</i> gtggtggggatagggtgg
<i>Casp8</i>	<i>Forward:</i> gaccacaaggacaaggactg <i>Reverse:</i> gggaagggcactctgaacc
<i>Casp9</i>	<i>Forward:</i> tgtggtggcgagcagaaaga <i>Reverse:</i> gggaaggtggaataggatac
<i>Ercc1</i>	<i>Forward:</i> ttgggaaagacgaggggaagc <i>Reverse:</i> ccggtgggaccgagggg
<i>Top2</i>	<i>Forward:</i> cctctcttctgcgtcatcg <i>Reverse:</i> cctttgatgtgctggtgcc
<i>Tp53</i>	<i>Forward:</i> cttcctctgcctcctgtcc <i>Reverse:</i> gtatcccaccaccctccc
<i>Xpf</i>	<i>Forward:</i> cagaggaagaccagcagaga <i>Reverse:</i> cacaagaggatggatgatgg

Para determinação da expressão relativa dos genes de interesse nas diferentes condições avaliadas foi utilizado o programa REST – versão 2009

(*Relative expression software tool*) (QIAGEN), desenvolvido por Pfaffl et al.,³⁵ baseado em seu próprio modelo matemático de quantificação relativa de dados obtidos por PCR em tempo real, com correção de eficiência. Foram considerados diferencialmente expressos quando comparados à situação controle os genes cuja alteração foi significativamente diferente, considerando-se o valor de $p \leq 0,001$ ou alterações maiores que 1,5 vezes considerando-se o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação da citotoxicidade: ensaio do MTT

Os resultados obtidos no ensaio do MTT demonstraram que as maiores concentrações de todas as drogas avaliadas neste estudo interferiram na viabilidade das células CHO-K1, como pode ser observado na Figura 1. Os resultados obtidos por meio das análises de regressão linear (dados não apresentados) revelaram que apenas os compostos HEMA e TFEMA demonstraram um padrão de citotoxicidade dependente da dose. Os valores de IC50 (Tabela 2) obtidos revelaram que o TFEMA demonstrou um padrão mais citotóxico do que os outros compostos avaliados em todos os tempos de tratamento. O TEGDMA e o HEMA apresentaram valores de IC50 similares em todos os tempos de tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de IC50 e R^2 obtidos após tratamento de células CHO-K1 com diferentes concentrações (mM) e em diferentes intervalos de tempo com TEGDMA, HEMA e TFEMA.

Droga	Tempo de tratamento (h)					
	24		48		72	
	IC50	R^2	IC50	R^2	IC50	R^2
TEGDMA	4,266	0,9946	2,084	0,5331	2,554	0,2846
HEMA	4,864	0,9141	2,467	0,9984	2,290	0,9994
TFEMA	2,224	0,9600	1,889	0,9565	1,943	0,9418

* Valores estatisticamente significativos com $p < 0,05$ no teste de regressão não linear.

R^2 – medida de ajustamento de um modelo estatístico de regressão não linear.

No tratamento de 24 h o TEGDMA foi citotóxico a partir de 5 mM, enquanto que nos tratamentos de 48 e 72 h a citotoxicidade para este composto ocorreu a partir da concentração de 3 mM (Figura 1). Por este motivo, foram escolhidas para a realização dos ensaios subsequentes as concentrações de 1, 2 e 3 mM em 24 h de tratamento.

O HEMA demonstrou citotoxicidade a partir da concentração de 7 mM no tratamento de 24 h, 6 mM em 48 h de tratamento e 4 mM em 72 h de tratamento (Figura 1). Deste modo, as concentrações escolhidas para os demais ensaios realizados neste estudo foram de 2, 4 e 6 mM, com tratamento de 24 h.

O TFEMA foi citotóxico nos tempos de tratamento de 24 e 48 h a partir de 5 mM e 4 mM em 72 h de tratamento (Figura 1). Assim, para os demais ensaios foram escolhidas as concentrações de 1, 2 e 4 mM, com tratamento de 24 h.

Avaliação da genotoxicidade: ensaio cometa (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE)

Após os tratamentos com os materiais dentários a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de exclusão com azul de Tripán, onde foi observada viabilidade superior a 93% e 96,67% nas células tratadas, respectivamente, com HEMA e TEGDMA durante 24 h. No tratamento das células com TFEMA observou-se viabilidade superior a 97,67% nas concentrações de 1 e 2 mM e viabilidade de 14% na maior concentração avaliada (4 mM), sendo esta a maior redução da viabilidade observada entre todos os materiais avaliados.

A Tabela 3 apresenta os escores e frequências de células CHO-K1 com danos no DNA tratadas por 24 h com os monômeros de metacrilato. O TEGDMA foi genotóxico apenas na concentração de 3 mM, sendo esta a única concentração que apresentou aumento significativo na frequência de células com danos no DNA (Tabela 3). O teste de tendência linear não indicou resposta dependente da dose.

As duas maiores concentrações de HEMA foram genotóxicas e todas as concentrações avaliadas apresentaram valores de células com danos no DNA significativamente diferentes daqueles obtidos no controle negativo (Tabela 3). O teste de tendência linear indicou um aumento dose dependente dos valores de escore ($p=0,0217$; $F=9,4778$).

Os resultados obtidos para o TFEMA revelaram que este composto foi genotóxico nas duas maiores concentrações avaliadas. Não foi observado efeito dose dependente para os valores de escore no teste de tendência linear. Todas as concentrações testadas induziram aumento significativo na frequência de células com danos no DNA (Tabela 3).

A comparação entre as genotoxicidades induzidas pelas drogas avaliadas indicou diferenças significativas entre os escores médios obtidos após tratamento das células CHO-K1 com 4 mM de TFEMA e HEMA, sendo que o HEMA foi mais genotóxico do que o TFEM ($p=0,02$).

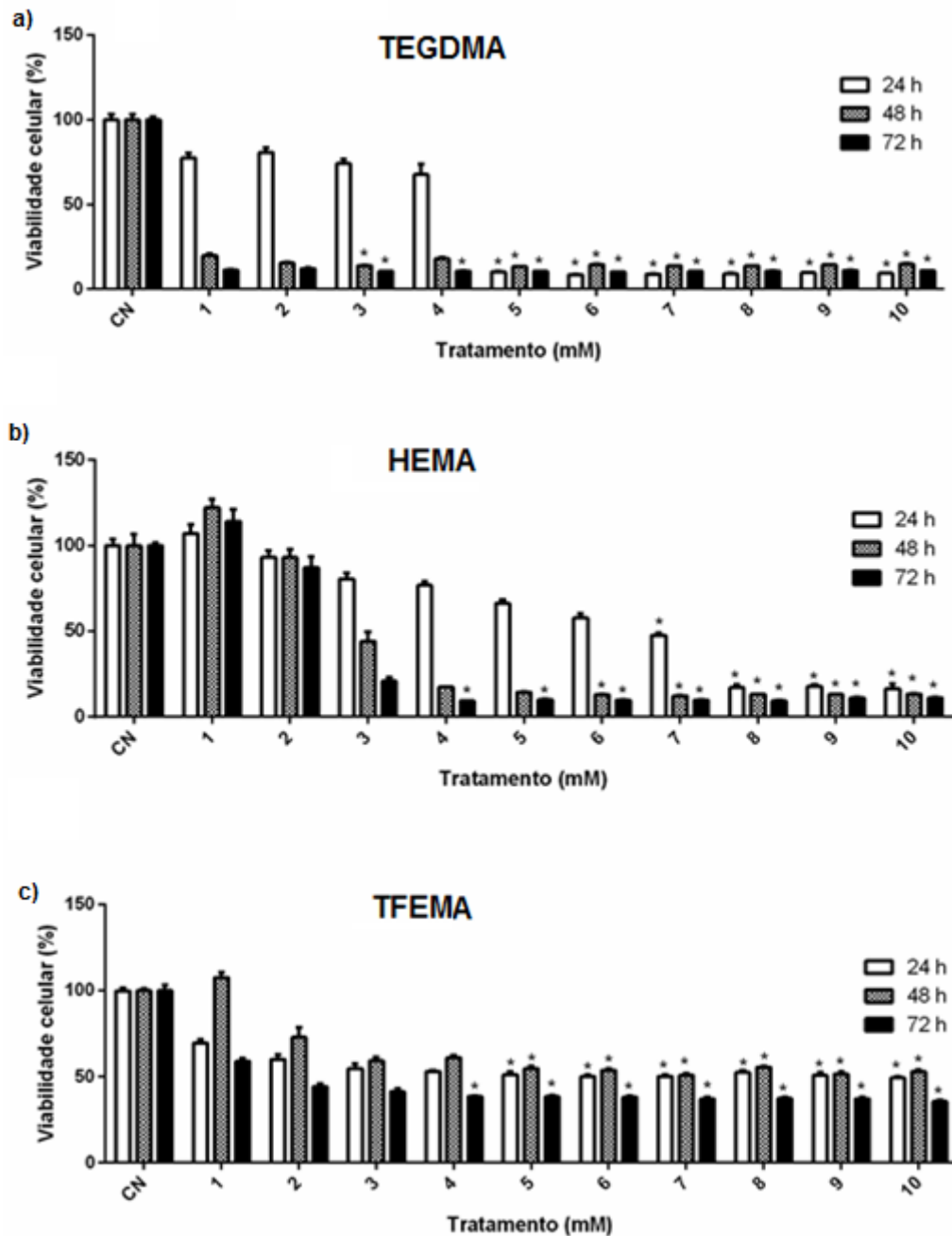


Figura 1: Viabilidade das células CHO-K1 obtidas no ensaio do MTT após 24, 48 e 72 horas de exposição a 10 diferentes concentrações de a) TEGDMA, b) HEMA e c) TFEMA.

Os valores são expressos em porcentagem de células viáveis, considerando-se a viabilidade do controle negativo como 100%.

As barras representam valores médios \pm desvio padrão de 7 replicatas. CN: controle negativo - tampão salino fosfato (PBS). * Valores significativamente diferentes do CN ($p < 0,05$) no teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

Tabela 3: Valores de escore e frequência de células com danos no DNA obtidos no ensaio do cometa após 24 horas de tratamento de células CHO-K1 com três concentrações diferentes de TEGDMA, HEMA e TFEMA.

TRATAMENTOS	Classes de Danos				Escore (X ± DP)	Células com danos no DNA (X ± DP)
	0	1	2	3		
PBS	65,00±13,00	28,67±12,22	4,67 ±5,51	1,67 ±2,89	0,43 ±0,21 ^a	0,35 ±0,13 ^a
DXR (0,75 µg/mL)	3,67±1,53	20,00±11,14	21,00±11,53	55,33±19,63	2,28±0,32 ^b	0,96±0,02 ^{bc}
TEGDMA (mM)						
1	39,33±28,29	41,67±22,14	11,00±4,36	8,00±4,36	0,88±0,39 ^{ac}	0,61±0,28 ^{ac}
2	37,67±10,69	45,00±14,93	9,00±6,24	8,33±6,03	0,88±0,22 ^{ac}	0,62±0,11 ^{ac}
3	11,33±6,43	44,33±14,15	26,67±17,21	15,67±5,51	1,45±0,36 ^c	0,87±0,09 ^{bc}
PBS	45,00±18,25	24,33±6,43	15,33 ±9,24	15,33 ±15,31	1,01 ±0,58 ^a	0,55 ±0,18 ^a
DXR (0,75 µg/mL)	7,67±0,58	16,00±2,00	23,67±8,50	52,67±10,02	2,21±0,11 ^{bc}	0,92±0,01 ^b
HEMA (mM)						
2	15,33±9,81	30,67±14,01	17,00±1,00	37,00±9,00	1,76±0,21 ^{ac}	0,85±0,10 ^b
4	6,00±1,73	28,67±2,51	27,67±2,52	37,67±4,16	1,97±0,12 ^{bc}	0,94±0,02 ^b
6	3,67±4,73	20,00±3,00	27,33±3,51	49,00±9,54	2,22±0,20 ^{bc}	0,96±0,05 ^b
PBS	92,00±3,61	7,00±3,61	0,67 ±0,58	0,33 ±0,58	0,09 ±0,04 ^a	0,08 ±0,04 ^a
DXR (0,75 µg/mL)	3,67±4,04	9,00±4,00	7,67±3,51	79,67±10,02	2,63±0,20 ^b	0,96±0,04 ^b
TFEMA (mM)						
1	70,33±4,62	10,67±1,15	7,00±3,46	12,00±2,00	0,61±0,12 ^{ad}	0,30±0,05 ^c
2	27,67±3,06	22,00±10,82	15,67±3,21	34,67±10,97	1,57±0,27 ^c	0,72±0,03 ^d
4	43,00±7,55	21,00±7,00	7,67±1,53	28,33±13,80	1,21±0,36 ^{cd}	0,57±0,08 ^e

PBS (tampão salino fosfato): controle negativo. **DXR – Doxorrubicina:** controle positivo. **X±DP =** média ± desvio padrão. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância pelo teste ANOVA/Tukey.

Avaliação do índice de Apoptose/Necrose

Os resultados referentes ao ensaio de índice de apoptose/necrose em células CHO-K1 tratadas com TEGDMA, HEMA e TFEMA podem ser observados na Tabela 4. Todas as drogas avaliadas neste estudo induziram aumento significativo no índice de apoptose.

Os dados sobre a indução da necrose demonstraram uma maior divergência. TEGDMA não foi capaz de induzir aumento significativo no índice de necrose, em todas as concentrações avaliadas. Já o HEMA e o TFEMA promoveram aumento significativo no índice de necrose apenas nas maiores concentrações testadas.

Avaliação da modulação da expressão gênica

Os dados referentes à expressão diferencial de genes nas células CHO-K1 submetidas a tratamento por 24 h com 1 mM de TEGDMA e TFEMA e 2 mM de HEMA indicaram que o TEGDMA levou à diminuição na quantidade de transcritos de todos os genes avaliados, exceto *Xpf*. Entretanto, houve redução significativa apenas para os genes *Casp8*, *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L* e *Top2* (Figura 2). No tratamento com HEMA, foi possível observar apenas a diminuição significativa dos transcritos de *Tp53* (Figura 2). O TFEMA, levou à diminuição significativa da quantidade de transcritos apenas para o gene *Top2* (Figura 2).

Tabela 4: Frequências absolutas (n) de células apoptóticas e necróticas obtidas para a linhagem celular CHO-K1 após tempo de exposição de 24 horas a 3 diferentes concentrações de TEGDMA, HEMA e TFEMA.

Tratamentos		Apoptose (200 céls./repetição)				Necrose (200 céls./repetição)			
		Repetições				Repetições			
		I	II	III	X ± DP	I	II	III	X ± DP
PBS		1	4	2	2,33±1,53 ^a	5	13	3	7,00±5,29 ^a
DXR	(0,75 µg/mL)	31	34	38	34,33±3,51 ^b	22	10	38	23,33±14,05 ^b
TEGDMA (mM)									
1		141	143	151	145,00±5,29 ^c	10	15	14	13,00±2,65 ^{ab}
2		172	167	181	173,33±7,09 ^d	7	5	7	6,33±1,16 ^a
3		192	191	197	193,33±3,21 ^e	4	7	2	4,33±2,52 ^a
PBS		0	25	14	13,00±12,53 ^a	2	3	2	2,33±0,58 ^a
DXR	(0,75 µg/mL)	49	35	18	34,00±15,52 ^b	16	2	1	6,33±8,39 ^a
HEMA (mM)									
2		86	119	74	93,00±23,30 ^b	3	5	3	3,67±1,16 ^a
4		104	164	169	145,67±36,17 ^{bc}	17	7	2	8,67±7,64 ^a
6		168	170	175	171,00±3,61 ^c	13	19	12	14,67±3,79 ^b
PBS		3	1	3	2,33±1,15 ^a	4	7	13	8,00±4,58 ^a
DXR	(0,75 µg/mL)	61	98	69	76,00±19,47 ^b	7	11	9	9,00±2,00 ^a
TFEMA (mM)									
1		181	181	172	178,00±5,20 ^c	10	15	18	14,33±4,04 ^a
2		176	179	191	182,00±7,94 ^c	12	15	5	10,67±5,13 ^a
4		41	46	35	40,67±5,51 ^d	153	148	157	152,67±4,51 ^b

PBS (tampão salino fosfato): controle negativo. **DXR – Doxorubicina:** controle positivo. **X±DP =** média ± desvio padrão. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância pelo teste ANOVA/Tukey.

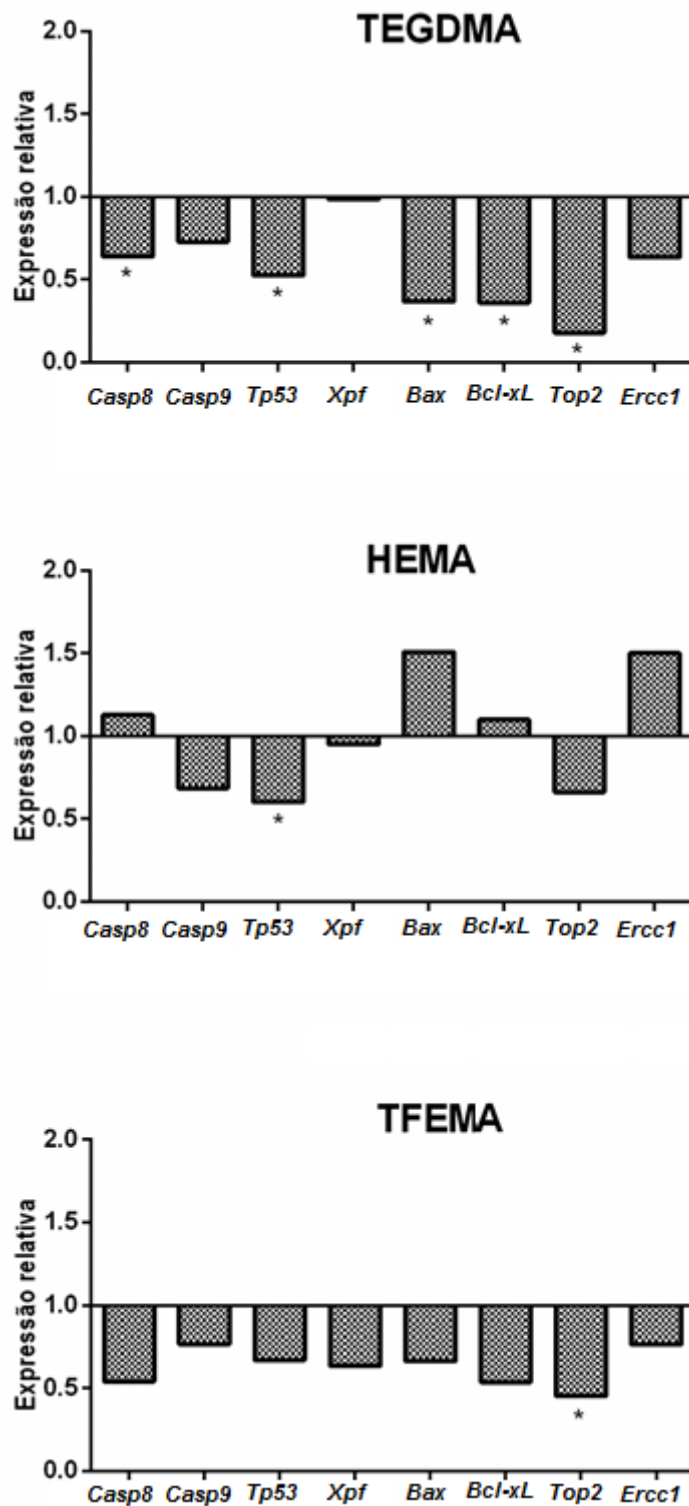


Figura 2: Modulação da expressão gênica em células CHO-K1 expostas a 1 mM de TEGDMA, 2 mM de HEMA e 1 mM de TFEMA por 24 horas.

*Genes diferencialmente expressos em relação ao controle negativo (PBS) considerando um valor de $p \leq 0,001$ ou $p < 0,05$ quando a razão de expressão for \geq que 1,5 vezes.

DISCUSSÃO

Inúmeros estudos *in vitro* têm sido realizados nos últimos anos com o objetivo de avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade dos materiais dentários.^{8,12,36} Entretanto, muitos aspectos relacionados com os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no potencial citotóxico destes materiais ainda precisam ser esclarecidos.

Os resultados do presente estudo revelaram um perfil de citotoxicidade baseado no IC50, obtido a partir dos dados do ensaio do MTT, onde o TFEMA apresentou, de uma maneira geral, o maior potencial citotóxico em todos os tempos de tratamentos avaliados, destacando-se os tempos de 48 e 72 h, além de também apresentar efeito genotóxico e promover a diminuição dos transcritos do gene *Top2*.

A potencialidade dos monômeros derivados de metacrilatos para induzir apoptose foi observada em vários outros estudos empregando diferentes tipos celulares, como células de glândulas submandibulares de ratos;^{15,20} macrófagos de ratos e células humanas derivadas da polpa;^{18,39} células Jurkat e do epitélio oral;⁷ linfócitos do sangue periférico humano¹⁷ e fibroblastos gengivais humanos.⁹ Estes dados associados aos do presente estudo sugerem fortemente que a citotoxicidade dos metacrilatos HEMA, TEGDMA e TFEMA pode se manifestar por meio da indução de apoptose. Adicionalmente, Szczepanska et al.⁹ afirmaram que a capacidade de HEMA de gerar danos no DNA também pode determinar sua capacidade de influenciar o ciclo celular e induzir a apoptose. Esta relação entre genotoxicidade e indução de apoptose foi comprovada em nosso estudo nas concentrações de 3 mM de TEGDMA, 4 e 6 mM de HEMA e 2 e 4 mM de TFEMA.

No presente estudo foi observado que o TFEMA induziu, em células CHO-K1, aumento significativo de necrose apenas na maior concentração avaliada (4 mM), corroborando os resultados obtidos por meio do ensaio de exclusão com azul de Tripán, onde foi observada, nesta concentração, uma redução da viabilidade celular para 14%. Estes dados sugerem que, em altas concentrações (acima de 4 mM), o TFEMA induza uma forte toxicidade, promovendo severas e irreversíveis lesões celulares, resultando na elevada taxa de necrose em células CHO-K1 observada neste estudo. Este perfil de morte celular observado nos tratamentos com TFEMA foi semelhante àqueles observados por Spagnuolo et al.⁴⁰ com TEGDMA e por Samuelsen et al.²⁰ com TEGDMA e HEMA.

A capacidade dos monômeros HEMA e TEGDMA de induzir danos no material genético em células CHO-K1 observada neste estudo corrobora os dados da literatura.^{9,17,22,42,45} Além disso, nossos resultados revelaram que o TFEMA também foi capaz de induzir efeitos genotóxicos em todas as concentrações avaliadas, sugerindo que este composto apresenta genotoxicidade similar ao HEMA e TEGDMA. Em contrapartida, o TFEMA, de um modo geral, induziu menor frequência de células com danos no DNA em comparação com os demais monômeros avaliados. Este é um importante resultado, visto que, até o presente momento, não temos conhecimento de estudos que tenham avaliado a genotoxicidade do TFEMA.

Uma vez que a remoção de bases oxidadas geralmente envolve os mecanismos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos ou por excisão de bases, no presente trabalho foi avaliada a capacidade dos monômeros TEGDMA, HEMA e TFEMA de interferir na modulação da expressão de dois importantes genes associados a estes mecanismos de reparo, o *Ercc1* e o *Xpf*. Os produtos proteicos destes genes se unem para formar um heterodímero *Ercc1/Xpf*, que também está envolvido no reparo de quebras de fitas duplas de DNA e ligações cruzadas intercadeias (“*cross-link*”), que podem ocorrer como consequência de danos oxidativos.⁴³ Entretanto, nossos achados demonstraram que nenhuma das drogas aqui avaliadas foram capazes de alterar a expressão destes genes. Estes dados corroboram os encontrados por Schweikl et al.,⁴⁴ que observaram que o TEGDMA não interferiu no nível de transcrição do gene *Ercc1*.

Com o objetivo de melhor entender as respostas biológicas moleculares promovidas pelos monômeros de metacrilatos, avaliamos a capacidade destes materiais de interferir na expressão do fator de transcrição *Tp53*, que tem sua expressão aumentada em resposta a danos no DNA. Este gene é responsável pela regulação de diversas respostas adaptativas, como o reparo do DNA, progressão e bloqueio do ciclo celular e apoptose.⁴⁵

O envolvimento da proteína p53 na toxicidade promovida pelos monômeros de metacrilatos avaliados neste estudo não pode ser confirmada, visto que, em nível transcricional, tanto o HEMA como o TEGDMA modularam negativamente a expressão deste gene, enquanto o TFEMA não promoveu mudanças significativas na sua expressão. Schweikl et al.⁴⁶ demonstraram que a toxicidade do TEGDMA pode ser mediada tanto por vias dependentes quanto independentes da proteína

p53. Posteriormente, Schweikl et al.⁴⁴ também verificaram que este composto não foi capaz de afetar a expressão deste gene. Segundo estes autores, o TEGDMA poderia interferir na ativação da proteína p53 por meio de alterações pós-traducionais, sem modificar seu nível transcricional.

A associação da proteína p53 com a indução de apoptose promovida por metacrilatos foi verificada por Schweikl et al.⁴⁷ Neste estudo os autores observaram, em macrófagos de ratos RAW264.7, um aumento significativo nas concentrações da proteína p53 após exposição ao HEMA, acompanhado pelo aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Puma, Bax e Bad) e anti-apoptóticas (Bcl-x_L). Os dados do presente estudo divergem dos obtidos por estes autores, pois o TEGDMA modulou negativamente a expressão dos genes *Tp53*, *Bax* e *Bcl-x_L*, enquanto o HEMA e o TFEMA não interferiram na expressão dos três genes. De acordo com Schweikl et al.⁴⁷ a redução nos níveis de expressão das proteínas da família Bcl-2 pode estar relacionada a um estresse oxidativo severo e redução da viabilidade celular indicada pelo ensaio do MTT. Esta associação foi claramente observada no presente estudo para o TEGDMA, visto que a redução dos níveis de expressão dos genes *Bax* e *Bcl-x_L* foi acompanhada pela diminuição da viabilidade celular obtida no ensaio do MTT.

Ainda com o objetivo de delinear os mecanismos envolvidos na indução de apoptose pelos materiais dentários, neste estudo avaliamos a modulação da expressão de duas importantes proteínas envolvidas na indução deste fenômeno: a Caspase 8 e a Caspase 9. Nenhuma das drogas avaliadas foi capaz de modular a expressão das caspases -8 e -9, sendo que apenas o TEGDMA induziu diminuição nos níveis de expressão da caspase-8, sugerindo que, em células CHO-K1, a apoptose promovida pelos monômeros de metacrilatos (TEGDMA, HEMA e TFEMA) ocorre por meio de outras caspases iniciadoras, diferentes das caspases -8 e -9.

Estes resultados contradizem achados da literatura onde foi observado que a apoptose induzida pelo HEMA estava envolvida com a ativação das caspases-8 e -9⁴¹ ou somente da caspase-9.²⁰ Samuelsen et al.²⁰ observaram aumento nos níveis da caspase-9 quando avaliaram o TEGDMA. Além disso, devido ao fato dos monômeros HEMA e TEGDMA induzirem alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais, tem sido sugerido que a apoptose promovida por estes compostos dependa da ativação da via intrínseca.^{20,47}

Os resultados do presente estudo demonstraram que o TFEMA foi mais citotóxico do que o TEGDMA e HEMA observado pelo alto índice de apoptose das células CHO-K1. Assim, nossos experimentos suportam a hipótese de que o TFEMA pode induzir apoptose, danos no DNA e *downregulation* do gene *Top2* em culturas de células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) de maneira concentração e tempo dependente. Estes dados devem ser de significância clínica considerável, já que o TFEMA tem sido alvo de inúmeras investigações científicas, com o intuito de utilizar este composto em formulações comerciais com diversas aplicações na prática odontológica.^{24, 25}

CONCLUSÕES

Podemos concluir que os três compostos avaliados apresentaram efeitos genotóxicos apenas nas maiores concentrações estudadas, mas foram capazes de induzir apoptose em todas as concentrações avaliadas. A necrose foi induzida pelo HEMA e TFEMA, somente nas maiores concentrações avaliadas. As análises de expressão gênica não apresentaram um padrão que permitisse inferir seguramente sobre o envolvimento dos genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L*, *Casp-8*, *Casp-9*, *Ercc1*, *Xpf* e *Top2* na toxicidade dos materiais dentários aqui avaliados, mas poderão contribuir para estudos futuros na área. Além disso, tais resultados sugerem que provavelmente a toxicidade do TEGDMA, HEMA e TFEMA em células CHO-K1 ocorra de modo independente da expressão dos genes aqui avaliados. Finalmente, nossos dados sugerem que, em virtude do forte potencial tóxico demonstrado pelo TFEMA em células CHO-K1, a utilização deste composto na formulação de materiais odontológicos deva ser realizada com muita cautela, sendo necessária a realização de outros estudos *in vitro* e *in vivo* para que se confirme tais resultados.

Agradecimentos

À CAPES/PROAP, à Universidade Norte do Paraná-UNOPAR e à UEL pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

1. Blasiak J, Synowiec E, Tarnawska J, Czarny P, Poplawski T, Reiter RJ. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA

- double strand breaks and the inhibition of their repair. *Mol Biol Rep* 2012;39:7487–7496.
2. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutation Research* 2009a;672:103–112.
 3. Durner J, Walther UI, Zaspel J, Hickel R, Reichl FX. Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells. *Biomaterials* 2010;31:818–823.
 4. Huang FM, Li YC, Lee SS, Chang YC. Cytotoxicity of dentine bonding agents on human pulp cells is related to intracellular glutathione levels. *International Endodontic Journal* 2010;43:1091–1097.
 5. Bianchi L, Ribeiro APD, Carrilho MRO, Pashley DH, Costa CAS, Hebling J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res Part B* 2013;00B:000–000.
 6. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006;85:870–877.
 7. Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. Mechanisms of N-acetyl Cysteine-mediated Protection from 2-Hydroxyethyl Methacrylate-induced Apoptosis. *J Endod* 2008;34:1191–1197.
 8. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials. *Int. J. Mol. Sci* 2009b;10: 3861-3899.
 9. Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, Blasiak J. 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep* 2012;39:1561–1574.
 10. Jung YJ, Hyun HK, Kim YJ, Jang KT. Effect of collagenase and esterase on resin-dentin interface: a comparative study between a total-etch adhesive and a self-etch adhesive. *Am J Dent* 2009;22:295–298.
 11. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Effects of HEMA and TEGDMA on the *in vitro* odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. *Dental Materials* 2011;27:608–617.
 12. Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, Blasiak J. Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep* 2011;38:4603–4611.
 13. Reichl FX, Durner J, Hickel R, Kunzelmann KH, Jewett A, Wang MY. Distribution and excretion of TEGDMA in guinea pigs and mice. *J Dent Res* 2001;80:1412–1415.
 14. Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate Heat Shock Protein 72 expression in Heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *Journal of Dental Research* 2002;81(4):265-269.
 15. Samuelsen, J.T., Holme, J.A., Becher, R., Karlsson, S., Morisbak, E., Dahl, J.E. HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis *in vitro*. *Dental materials* 2008;24: 134–140.
 16. Mavrogonatou, E., Eliades, T., Eliades, G., Kletsas, D. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on p53-dependent G2 arrest in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2010;31: 8530-8538.

17. Pawlowska, E., Poplawski, T., Ksiazek, D., Szczepanska, J., Blasiak, J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. *Mutation Research* 2010;696: 122–129.
18. Krifka, S., Petzel, C., Bolay, C., Hiller, K.A., Spagnuolo, G., Schmalz, G., Schweikl, H. Activation of stress-regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. *Biomaterials* 2011;32: 1787-1795.
19. Lefeuvre, M., Amjaad, W., Goldberg, M., Stanislawski, L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005;26: 5130–5137.
20. Samuelsen, J.T., Dahl, J.E., Karlsson, S., Morisbak, E., Becher, R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dental Materials* 2007;23: 34–39.
21. Demirci, M.; Hiller, K-A; Bosl, C; Galler, K; Schmalz, G & Schweikl, H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dental materials* 2008;24: 362-371.
22. Eckhardt, A., Gerstmayr, N., Hiller, K.A., Bolay, C., Waha, C., Spagnuolo, G., Camargo, C., Schmalz, G., Schweikl, H. TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials* 2009;30: 2006–2014.
23. Ribeiro, D. Single-Cell Gel (Comet) Assay as a Promising Tool for the Detection of DNA Damage Induced by Compounds Used in Dental Practice: The Oral Cancer Risk Assessment. *Critical Reviews™ in Oncogenesis* 2008;14(2-3): 165–175.
24. Kasuga, Y., Akiba, N., Minakuchi, S., Uchida, T., Matsushita, N., Hishimoto, M., Hayakawa, I. Development of soft denture lining materials containing fluorinated monomers. *J Jpn Prosthodont Soc* 2008;52: 183-188.
25. Kadoma, Y., Tamaki, Y. Bonding durability against water of a fluorine-containing resin for precious metal alloys. *Dental Materials Journal* 2009;28(5): 642–648.
26. Chang H-H, Chang M-C, Lin L-D, Lee J-J, Wang T-M, Huang C-H, Yang T-T, Lin, H-J, Jeng J-H. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials* 2010; 31: 6917-6925.
27. Bahr, S.M., Borgschulte, T., Kayser, K.J., Lin, N. Using Microarray Technology to Select Housekeeping Genes in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2009;104: 1041–1046.
28. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal Immunological Methods* 1983;65(1-2): 55-63.
29. Ostling, O., Johanson, KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984;123: 291-298.
30. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988;175: 184-191.
31. Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 1995;3:103-115.
32. Manoharan, K., Banerjee, M.R. Measurements of chemical carcinogen-induced sister-chromatid exchanges in a whole organ in vitro. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 1985;147(4):165-169.

33. McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboudi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., Green, D. R. The end of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis In vitro, in: *Methods in Cell Biology*. L. M. Schurartz, B. A. Osbourne (Eds), Academic Press 1995;46: 153-184.
34. Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 2012;33:366–369.
35. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e36.
36. Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials* 2010;31:2010–2014.
37. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dental Materials* 2006;22:630-640.
38. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dental materials* 2006;22:1086–1092.
39. Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials* 2010;31:2964–2975.
40. Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Amplifies TEGDMA-induced Apoptosis in Primary Human Pulp Cells. *J Dent Res* 2004a;83(9):703-707.
41. Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paternò R, Schweikl H, Avvedimento EV, Rengo S. NF- κ B Protection against Apoptosis Induced by HEMA. *J Dent Res* 2004b;83: 837-842.
42. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl F-X. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials* 2006;27:1762–1770.
43. Kirschner K, Melton DW. Multiple Roles of the ERCC1-XPF Endonuclease in DNA Repair and Resistance to Anticancer Drugs. *Anticancer Research* 2010; 30: 3223-3232.
44. Schweikl H, Hiller K-A, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, Schmalz G. Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 2008;29:1377-1387.
45. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 2013;34:4555-4563.
46. Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 2005;26:4111–4118.
47. Schweikl H, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Buchalla W, Krifka S. 2-Hydroxyethyl methacrylate-induced apoptosis through the ATM and p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway. *Biomaterials* 2014;35:2890-2904.

5 ARTIGO 2

“Citotoxicidade, genotoxicidade e modulação da expressão gênica induzidos por peróxido de hidrogênio em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1)”

Artigo submetido ao periódico: ***Journal of Dentistry***

Fator de impacto: 3.02

“Citotoxicidade, genotoxicidade e modulação da expressão gênica induzidos por peróxido de hidrogênio em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1)”

Bello, VA¹; Cilião, HL¹; Oliveira, MT¹; Cólus, IMS¹; Poli-Frederico, RC^{2*}

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina

²Departamento de Odontologia, Universidade Norte do Paraná

*** Autor para correspondência:**

Regina Célia Poli-Frederico

Departamento de odontologia, Av. Paris 675, 86041-120 Londrina, PR, Brazil.

Tel.: +55 43 3371-7820; fax: +55 43 3324-9972.

E-mail: reginafrederico@yahoo.com.br (R.C. Poli-Frederico).

Resumo

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do H_2O_2 , usado na prática odontológica, em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e o envolvimento deste material na modulação da expressão de genes envolvidos em diferentes processos biológicos.

Métodos: As células CHO-K1 foram cultivadas em Ham-F10 + DMEM. A citotoxicidade e genotoxicidade do peróxido de hidrogênio foram avaliadas utilizando, respectivamente, o ensaio do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) e o teste do cometa. Avaliação da modulação da expressão gênica foi obtida a partir da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Os resultados foram analisados pelos testes estatísticos Kruskal-Wallis/Dunn, ANOVA/Tukey. O valor de nível de significância empregado foi de 5%.

Resultados: Nossos resultados demonstraram que a concentração de 3,5 mM foi citotóxica e genotóxica para as células CHO-K1 e promoveu aumento significativo de células apoptóticas e necróticas. As alterações nas expressões gênicas indicaram que, em concentrações elevadas, o H_2O_2 parece levar a um aumento gradual de células necróticas em detrimento das apoptóticas observadas tanto no teste de apoptose/necrose quanto nos ensaios de expressão gênica, já que genes pró e anti-apoptóticos foram igualmente estimulados.

Conclusões: Concluímos que o H_2O_2 pode desenvolver toxicidade e alterar a expressão de genes, especialmente aqueles relacionados com apoptose/necrose e reparo de danos no DNA de células CHO-K1.

Significância clínica: Os severos efeitos citotóxico e genotóxico do H_2O_2 observados neste estudo, aliada a capacidade deste composto de induzir necrose em concentrações mais elevadas, sugerem que sua aplicação nos procedimentos odontológicos deve seguir critérios mais rigorosos tanto com relação ao tempo de exposição dos tecidos orais quanto as concentrações empregadas.

Palavras chave: H_2O_2 , MTT, ensaio cometa, apoptose, necrose, RT-qPCR.

1. Introdução

O clareamento dental é um dos tratamentos odontológicos estéticos mais procurados e valorizados pelos pacientes que buscam uma melhora na sua aparência. Apesar de ser um dos procedimentos mais comumente realizados na prática odontológica contemporânea, ainda existem controvérsias sobre a segurança deste tratamento e dos protocolos utilizados para realizá-lo, visto as evidências na literatura de seus efeitos deletérios.¹⁻⁵

A maioria dos produtos utilizados nas terapias de clareamento contém em sua composição o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou seu precursor, o peróxido de carbamida, e variam em relação à concentração de peróxido, modo de aplicação e tempo de exposição, assim como o tipo de aplicação (caseira ou em consultórios odontológicos).^{3,4,6,7}

Os potenciais efeitos adversos do H_2O_2 sobre os tecidos orais têm sido amplamente investigados, especialmente por ser um agente químico termicamente instável, com um alto potencial oxidativo. A maioria dos efeitos indesejáveis é dependente da técnica, da concentração do produto que é utilizado e do tempo de exposição.⁸ Como os resultados de branqueamento obtidos não são estáveis, repetições do tratamento acentuam estes efeitos, que ainda podem ser intensificados pelo uso de produtos de clareamento caseiro, vendidos diretamente para os consumidores e conhecidos como *Over-the-counter* (OTC), que incluem géis aplicados com placas, enxaguatórios bucais, gomas de mascar, cremes dentais e tiras adesivas.^{1,2,8} Em adição, a liberação de H_2O_2 e sua lenta degradação na saliva proporciona, de forma não desejada, um maior tempo de exposição das células da mucosa oral a altas concentrações deste composto, potencializando assim, seu efeito tóxico.⁹

Atualmente, decisões relacionadas com a administração ou não do produto em questão e o controle dos efeitos do clareamento dental devem ficar sob responsabilidade do dentista. Entretanto, apesar dos potenciais riscos do peróxido de hidrogênio à saúde, sua comercialização e facilidade de aquisição, sem qualquer restrição, possibilita um aumento progressivo na realização destes procedimentos no ambiente doméstico, sem supervisão de um profissional qualificado. A falta de orientação aliada ao uso abusivo e inadvertido, promove uma maior exposição dos indivíduos aos agentes clareadores e conseqüente acentuação de seus efeitos

tóxicos.¹⁰ De acordo com Goldberg et al.,⁸ o uso frequente de produtos de clareamento contendo 30% de H₂O₂ pode ser associado com o surgimento de diferentes tipos de alterações celulares nos tecidos orais, tais como hiperqueratose, hiperplasia e displasia. Entretanto, até o presente momento não há dados que demonstrem o surgimento de tumores após o uso exclusivo de H₂O₂. Assim, estudos que avaliem os efeitos tóxicos envolvidos na utilização do H₂O₂ e que permitam um maior esclarecimento dos processos biológicos associados, são de suma importância.

No presente estudo o peróxido de hidrogênio foi avaliado quanto à capacidade de induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1), bem como de interferir na modulação de genes envolvidos em diversos processos biológicos, principalmente aqueles relacionados com a apoptose e o reparo de danos no DNA.

2. Materiais e métodos

O H₂O₂ (ALDRICH, CAS N°: 7722-84-1) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Rodrigo Carvalho da Universidade Norte do Paraná, Londrina-PR e foi diluído em PBS (tampão salina fosfato) em concentrações de uso que variaram de 0,5 a 5,5 mM.

O cloridrato de doxorubicina (Adriamycin, Sigma-Aldrich, CAS N°: 23214-92-8) na concentração de 0,75 µg/mL foi utilizado como controle positivo nos ensaios do cometa e índice de apoptose/necrose.

2.1. Linhagem celular e condições de cultura

Todas as análises realizadas no presente estudo empregaram como modelo biológico a linhagem celular de ovário de hamster Chinês (CHO-K1), proveniente da Faculdade de Medicina de Leiden (Holanda) e gentilmente cedida ao nosso laboratório pela Profa. Dra. Sakamoto-Hojo da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP (SP, Brasil). Esta linhagem corresponde a um dos mais importantes modelos biológicos de células de mamíferos, amplamente empregada tanto em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade,^{11,12} como em análises de expressão gênica.¹³

As células da linhagem CHO-K1 foram mantidas em nitrogênio líquido e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² em meio de cultura Ham-F10 + DMEM

(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco™), na proporção 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco™, CAS N°: 12657-029), 1,2 g/L de bicarbonato de sódio (Reagen, CAS N°: 144-55-8), 0,06 g/L de penicilina G (Sigma-Aldrich, CAS N°: 113-98-4), 0,10 g/L de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, CAS N°: 3810-74-0) e 2,38 g/L de HEPES (Sigma-Aldrich, CAS N°: 7365-45-9). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa BOD (Fanem).

Para a realização dos experimentos foram sempre empregadas culturas que estivessem entre a 3ª. e 8ª. passagem. As células utilizadas nos experimentos foram subcultivadas sempre que atingiam uma confluência de 80%.

2.2. Avaliação de viabilidade celular: ensaio do MTT

O ensaio do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) foi realizado para avaliar a citotoxicidade do H₂O₂ em células CHO-K1 de acordo com o protocolo originalmente descrito por Mosmann¹⁴, com algumas modificações. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (aproximadamente 2x10⁴ células por poço em 200 µL de meio completo) por um período de 24 h para estabilização. Após este período as culturas foram submetidas a concentrações crescentes (0,5 a 5,5 mM) do peróxido de hidrogênio por diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6 e 12 h). As concentrações foram escolhidas a partir de dados da literatura.^{15,16} Logo após os tratamentos o meio de cultura foi aspirado e as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) por um período de 4 h a 37°C. Ao final deste período, a mistura da reação foi cuidadosamente aspirada e foram acrescentados em cada poço 200 µL de DMSO. Após cuidadosa homogeneização da placa, foi efetuada a quantificação da viabilidade celular por meio de espectrofotômetro tipo Elisa (Uniscience) a 550 nm. O tampão PBS foi utilizado em condições idênticas de tratamento, servindo como controle negativo. Os dados foram apresentados como percentual (%) de atividade mitocondrial ± desvio padrão de sete experimentos independentes na mesma placa.

2.3. Protocolo de tratamento para avaliação da genotoxicidade e do índice de apoptose/necrose

Os experimentos com os monômeros de metacrilato foram realizados de maneira independente, empregando os seguintes grupos experimentais: controle negativo (PBS), controle positivo (doxorubicina) e três concentrações de H₂O₂,

escolhidas a partir dos resultados obtidos no ensaio do MTT. Antes da realização dos tratamentos, as células CHO-K1 foram estabilizadas por 24 h em meio completo. O tempo de tratamento empregado nos experimentos foi de 3 h. Todos os grupos experimentais foram conduzidos em triplicata.

2.4. Avaliação de genotoxicidade: ensaio cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis* – SCGE)

O ensaio cometa foi utilizado para quantificar os danos causados pelo H₂O₂ à molécula de DNA, conforme metodologia descrita originalmente por Ostling & Johanson¹⁷ e modificada por Singh et al.¹⁸

Com o intuito de avaliar a viabilidade celular após os tratamentos com o H₂O₂, o ensaio de exclusão com azul de Tripán foi realizado em concomitância com o ensaio do cometa. Neste teste, após efetuada a fixação das células, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular de cada tratamento realizado foi homogeneizada com 10 µL de uma solução 0,4% de azul de Tripán (Merck, CAS N^o: 72-57-1). A mistura foi transferida para uma câmara de Neubauer e realizada a contagem de 200 células por tratamento, utilizando-se microscópio de luz invertido (Olympus - modelo CKX41) em objetiva de 20 X.

Após a avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão com azul de Tripán, alíquotas de 20 µL da suspensão celular foram homogeneizadas com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*LMP – low melting point*) 0,5% diluída em PBS. A mistura foi, então, aplicada em lâminas previamente preparadas, contendo uma fina camada de agarose (*NMP- normal melting point*) 1,5% diluída em PBS e cobertas com lamínula. Depois da incubação das lâminas por 20 minutos a 4°C, as lamínulas foram removidas e as lâminas submersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10 mM TRIS, 10% de DMSO, 1% de Triton X, pH 10), por um período de 1 hora e 30 minutos a 4° C. Depois da lise, as lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese (200 mM EDTA, 10 N NaOH, pH13) por 20 minutos e então submetidas à corrida de eletroforese (25 V, 300mA) por um período de 20 minutos a 4°C. Em seguida as lâminas foram neutralizadas (TRIS 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, secas e fixadas em álcool absoluto. As lâminas foram conservadas a 4°C até a análise citológica.

Para as análises, as lâminas foram coradas com uma alíquota de 45µL de solução de Gelred™ (Biotium, CAS N^o: 76544-02-0) 10.000 X diluído em solução de

NaCl 0,1 M para a obtenção de uma concentração final de 30 X e foram analisados 100 nucleoides para cada repetição. Todas as análises foram conduzidas em microscópio de fluorescência (Nikon) em objetiva de 40 X, com filtro de excitação de 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm.

O método empregado para mensurar o nível de dano genético obtido nos tratamentos foi o visual, com a avaliação do comprimento da cauda formada em relação ao tamanho do nucleóide. Durante as análises os nucleóides foram classificados em 4 classes de cometa (0 a 3), onde a classe 0 correspondia à ausência completa de cauda, e a classe 3 à cauda equivalente ao diâmetro de dois nucleóides.¹⁹

2.5. Avaliação do índice de Apoptose/Necrose

O protocolo empregado neste ensaio foi baseado naquele descrito originalmente por McGahon et al.²⁰ As condições de tratamento e colheita da suspensão celular foram efetuadas de forma idêntica àquela realizada para o ensaio do cometa. Para a realização do teste uma alíquota de 25 µL da suspensão celular de cada tratamento foi misturada a 1 µL da solução de coloração [100 µg/mL de brometo de etídeo (Merck, CAS Nº: 1239-45-8) e 100 µg/mL de laranja de acridina (Merck, CAS Nº: 65-61-2)]. Em seguida a suspensão celular foi transferida para lâminas de vidro limpas e secas, que foram imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon), em objetiva 40X, com filtro de excitação 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm.

Foram analisadas em cada lâmina um total de 200 células, diferenciando-as através da morfologia e coloração em três categorias celulares: células normais, células apoptóticas e células necróticas.

2.6. Avaliação da modulação da expressão gênica: extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Após a estabilização de 1×10^5 células da linhagem CHO-K1 cultivadas em placa de 24 poços com 1 mL de meio completo, as culturas foram submetidas aos seguintes tratamentos: PBS (Controle negativo), H₂O₂ (1,5 mM e 2,5 mM) durante 3 horas. O experimento foi realizado 3 vezes, com triplicata técnica de cada condição.

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se a extração do RNA total com o reagente TRIzol® (Invitrogen – Life Technologies) em associação com o Kit Pure

Link® RNA mini kit (Ambion), segundo as especificações do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA foram determinadas por espectrofotometria (Biophotometer - Eppendorf), levando em consideração para validação amostral a razão de absorvância 260/280 entre 1,7 e 2,0. A integridade do RNA e a presença de contaminação por DNA genômico foi verificada por eletroforese em gel de agarose denaturante segundo Aranda et al.²¹

O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng do RNA total extraído. O volume final da reação foi de 20 µL, composto por 10% de tampão de reação (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl – Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen), 80 pmol de Oligo dT12-18 (Invitrogen), 100 pmol de Random Primers (Invitrogen), 10 unidades da enzima SuperScript III (Invitrogen) e 2 unidades da enzima RNase Out (Invitrogen). Inicialmente, uma mistura constituída apenas por RNA, Oligo dT12-18, Random Primers e dNTPs foi submetida a uma pré-incubação de 10 minutos a 65° C em termociclador Veriti (Applied Biosystems), seguido de choque térmico em gelo. Uma segunda mistura contendo os demais constituintes foi preparada e adicionada à mistura inicial, totalizando 20 µL. A mistura final obtida foi submetida ao seguinte programa de reação em termociclador Veriti: 2 minutos a 25° C, 45 minutos a 50° C e 15 minutos a 70° C.

Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa e a possibilidade do efeito Monte Carlo, três reações distintas de síntese de cDNA foram realizadas para cada experimento, cujos produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada amostra em sua respectiva condição de cultivo.

Os dados referentes à expressão gênica foram obtidos pelo emprego da técnica de PCR em tempo real, com a utilização do sistema Techne Quantica Real Time PCR Thermal Cycler (Techne). Para tal, foi utilizado o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante, para um volume final de 20 µL, utilizando 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 250 ng de cDNA molde. A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 95° C por 5 minutos; 40 repetições de ciclos de 15 segundos a 95° C (desnaturação), 15 segundos a 60° C (anelamento) e 30 segundos a 72° C (extensão). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados empregando-se o software Gene Runner versão 3.05 (<http://www.generunner.com>). As sequências dos

genes alvo *Casp8*, *Casp9*, *Bax*, *Bcl-x_L*, *Tp53*, *Ercc1*, *Xpf* e *Top2* foram obtidas a partir de regiões específicas descritas e depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra assegurando-se que apenas o produto de interesse fosse amplificado em cada reação, por meio da curva de fusão (melting curve), variando-se a temperatura de 50° C a 98° C em 0,5° C/2 segundos. Os dados foram analisados pelo Quansoft software (Techne). A eficiência de cada primer foi determinada pelo método da curva de diluição.²²

Os valores obtidos na situação controle (ausência de tratamento) foram utilizados como referência para comparação, e os cálculos foram normalizados a partir do gene de referência *Yaf2* (*YY1 associated factor 2*), cuja sequência foi descrita por Bahr et al.¹³ Foram considerados apenas valores de Cq (*quantification cycle*) com uma variação de $\pm 0,5$ entre as triplicatas de reação.

2.7. Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados quanto à distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados obtidos no ensaio do MTT não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram analisados estatisticamente utilizando-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis/Dunn e análise de regressão não linear, enquanto que para os dados obtidos no ensaio do cometa, com distribuição normal, foram empregados os testes paramétricos ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores de escore também foram submetidos ao teste de tendência linear. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio dos Programas GraphPad InStat (versão 3.05 GraphPad Software, Inc.) e GraphPad Prism (versão 6.01), tendo sido estabelecido um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para todos os testes aplicados.

Para determinação da expressão relativa dos genes de interesse nas diferentes condições avaliadas foi utilizado o programa REST – versão 2009 (*Relative expression software tool*) (QIAGEN), desenvolvido por Pfaffl et al., baseado em seu próprio modelo matemático de quantificação relativa de dados obtidos por PCR em tempo real, com correção de eficiência. Foram considerados diferencialmente expressos quando comparados à situação controle os genes cuja alteração foi significativamente diferente, considerando-se o valor de $p \leq 0,001$ ou alterações maiores que 1,5 vezes considerando-se valor de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Avaliação de viabilidade celular: ensaio do MTT

Os resultados obtidos no ensaio do MTT (Figura 1) demonstraram que todas as concentrações de H_2O_2 avaliadas neste estudo interferiram na viabilidade celular das células CHO-K1. O peróxido de hidrogênio mostrou um padrão de citotoxicidade dependente do tempo de exposição. De uma forma geral, a partir da concentração de 1 mM de H_2O_2 foi possível observar uma diminuição de aproximadamente 50% da viabilidade celular em todos os tempos analisados, baseado na redução do MTT. Entretanto, as análises estatísticas indicaram que o H_2O_2 em células CHO-K1 foi significativamente citotóxico apenas a partir da concentração de 3 mM no tratamento de 1 h, 3,5 mM após 3 h e 2,5 mM após 6 h de tratamento (Figura 1). Após 12 h de tratamento, todas as concentrações de H_2O_2 avaliadas neste estudo foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade das células CHO-K1 (Figura 1).

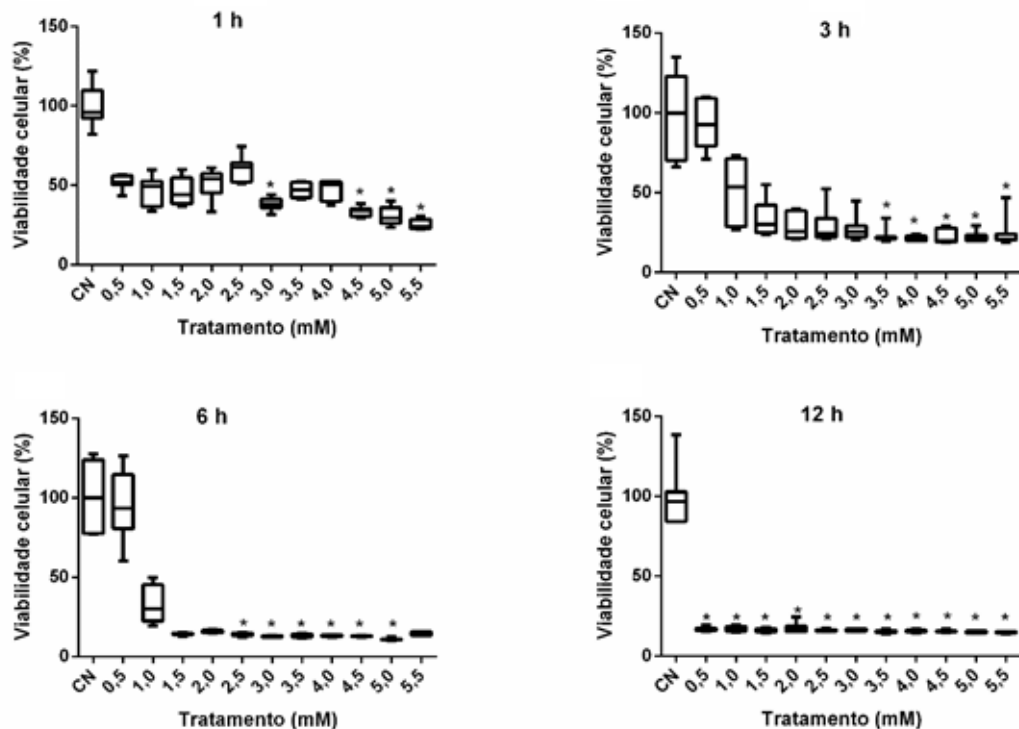


Figura 1: Viabilidade das células CHO-K1 obtidas no ensaio do MTT após 1, 3, 6 ou 12 horas de exposição a 11 diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

As barras representam valores médios \pm desvio padrão de 7 replicatas. CN: controle negativo.

* Valores estatisticamente diferentes do CN ($p < 0,05$) no teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

3.2. Avaliação de genotoxicidade: ensaio do Cometa

Os resultados obtidos a partir do ensaio de exclusão com azul de tripan em células CHO-K1 tratadas com H₂O₂ revelaram que a viabilidade celular permaneceu sempre superior a 91% nas três concentrações avaliadas (1,5, 2 e 2,5 mM).

A Tabela 1 apresenta os escores e frequências de danos de DNA em células CHO-K1 tratadas por 3 h com peróxido de hidrogênio nas concentrações de 1,5, 2 e 2,5 mM. Os resultados revelaram que todas as concentrações avaliadas foram genotóxicas e induziram aumento significativo na frequência de células com danos no DNA. O teste de tendência linear indicou não haver efeito dose dependente em nenhum dos tratamentos realizados.

Tabela 1: Valores de escores e frequências de células com danos no DNA obtidos no ensaio do cometa após 3 horas de tratamento de células CHO-K1 com três concentrações diferentes de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

TRATAMENTOS (mM)	Classes de Danos				Escore (X ± DP)	Céls. com dano (X ± DP)
	0	1	2	3		
PBS	44,00±23,64	49,33±23,18	6,67 ±6,66	0,33 ±0,58	0,64 ±0,25*	0,56 ±0,23*
DXR (0,75 µg/mL)	5,33±8,39	11,67±10,50	25,00±17,32	58,0±35,16	2,36±0,62	0,95±0,08
H₂O₂						
1,5	1,00±1,73	28,00±17,52	22,33±5,69	48,67±13,58	2,19±0,34	0,99±0,02
2	1,33±0,58	20,00±6,00	33,67±8,33	45,00±11,53	2,22±0,17	0,99±0,01
2,5	2,67±2,08	5,33±5,86	20,33±16,20	71,67±20,55	2,61±0,24	0,97±0,02

PBS (tampão salino fosfato): controle negativo. DXR – Doxorrubicina: controle positivo. X±DP = média ± desvio padrão.

*Valor estatisticamente diferente dos demais ao nível de 5% de significância pelo teste ANOVA/Tukey.

3.3. Avaliação do índice de Apoptose/Necrose

Os resultados referentes ao ensaio de índice de apoptose/necrose em células CHO-K1 tratadas com peróxido de hidrogênio podem ser observados na Tabela 2.

Foi possível observar um aumento significativo de células tanto em apoptose quanto em necrose em todas as concentrações de peróxido de hidrogênio testadas, quando comparado ao controle negativo. Conforme se aumentou a concentração de peróxido avaliada, houve uma diminuição da porcentagem de células apoptóticas,

que mesmo assim se manteve significativamente maior em relação ao controle negativo, e um aumento gradual de células necróticas, estabelecendo, desta forma, uma razão inversamente proporcional entre os dois eventos, de acordo com a concentração de H₂O₂ utilizada. Estes resultados indicam a indução de morte celular promovida por todas as concentrações de H₂O₂ testadas, após 3 horas de tratamento.

Tabela 2: Frequências absolutas (n) de células apoptóticas e necróticas obtidas em células CHO-K1 após tratamento com 3 diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 3 horas

Tratamentos (mM)	Apoptose (200 céls./repetição) Repetições				Necrose (200 céls./repetição) Repetições			
	I	II	III	X±DP	I	II	III	X±DP
PBS	0	0	1	0,33±0,58 ^a	3	8	2	4,33±3,21 ^a
DXR (0,75 µg/mL)	165	186	197	182,67±16,26 ^b	1	8	1	3,33±4,04 ^a
H₂O₂								
1,5	123	141	101	121,67±20,03 ^c	51	49	83	61,00±19,08 ^b
2	75	84	77	78,67±4,73 ^d	102	98	114	104,67±8,33 ^c
2,5	45	25	40	36,67±10,41 ^e	149	173	156	159,33±12,34 ^d

PBS (tampão salino fosfato): controle negativo. DXR – Doxorubicina: controle positivo. X±DP = média ± desvio padrão. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância pelo teste ANOVA/Tukey.

3.4. Avaliação da modulação da expressão gênica por RT-qPCR

A Figura 2 apresenta os dados de expressão gênica obtidos para RT-qPCR em resposta à exposição das células CHO-K1 ao peróxido de hidrogênio. Foi possível observar que na concentração de 1,5 mM de H₂O₂ os genes *Casp9*, *Xpf* e *Top2* foram negativamente regulados em, respectivamente, -2,17; -1,87 e -1,69 vezes. Apenas o gene *Bcl-x_L* teve sua regulação aumentada (1,7 vezes) nesta condição de tratamento. Já na concentração de 2,5 mM de H₂O₂ os genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L* e *Ercc1* foram positivamente regulados em, respectivamente, 1,78; 1,98; 2,00 e 1,98 vezes.

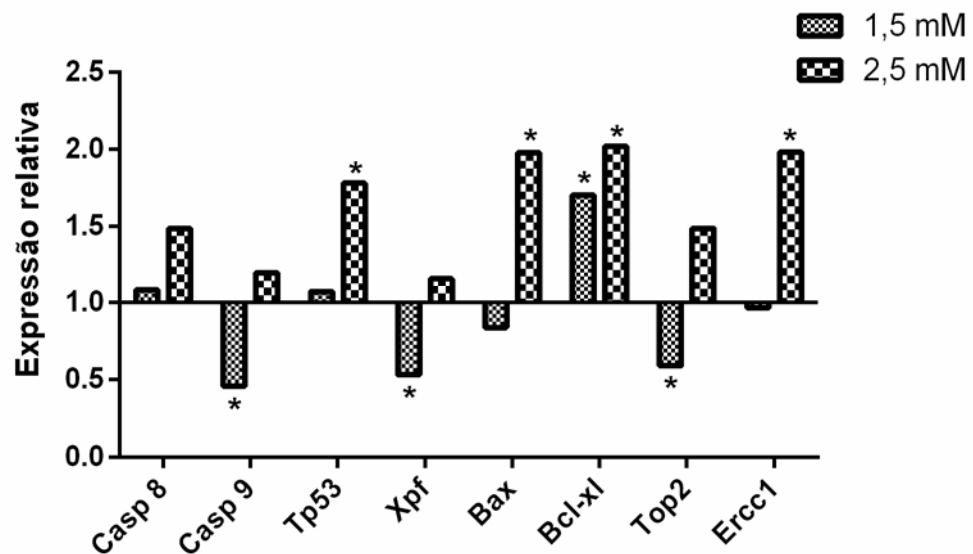


Figura 2: Modulação da expressão gênica em células CHO-K1 expostas a 1,5 e 2,5 mM de H₂O₂ por 3 horas.

*Genes diferencialmente expressos em relação ao controle negativo (PBS) considerando-se um valor de $p \leq 0,001$ ou $p < 0,05$ quando a razão de expressão for \geq que 1,5.

4. Discussão

Os agentes clareadores são geralmente avaliados quanto à sua difusão através da dentina e capacidade de alterar a cor dos dentes, bem como seu potencial de causar danos aos tecidos circundantes, a fim de garantir a eficácia e segurança de sua utilização para o branqueamento dentário.²³ Ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade têm sido empregados para a avaliação inicial dos possíveis efeitos tóxicos dos materiais branqueadores utilizados na odontologia.⁸ Entretanto, poucas análises têm sido conduzidas sobre os efeitos destes compostos quanto a modulação da expressão de genes envolvidos nos mecanismos biológicos associados com sua toxicidade, especialmente os processos de apoptose e reparo de danos no DNA.

No presente estudo foi verificada, a partir do ensaio do MTT, após uma hora de exposição celular, a diminuição estatisticamente significativa na viabilidade das células CHO-K1 a partir da concentração de 3 mM de H₂O₂. Contudo, outros trabalhos observaram efeitos citotóxicos empregando concentrações de H₂O₂ inferiores. Hanks et al.¹⁵ demonstraram uma diminuição da atividade da succinil

desidrogenase em células de fibroblastos de camundongo (linhagem Balb/c 3T3) após 1 h e 6 h de tratamento com, respectivamente, 0,58 mM e 0,44 mM de H₂O₂. Fernandez et al.⁶ também utilizaram células Balb/c 3T3 e verificaram, após 24 h de tratamento, efeito tóxico do peróxido de hidrogênio em concentrações que variaram de 0,001 a 10 mM. Min et al.¹⁶ encontraram efeitos citotóxicos em cultura primária de células pulpares humanas, empregando concentrações de H₂O₂ mais baixas (0,05 a 0,5 mM) e tratamentos de 6 a 48 horas. Os resultados obtidos no presente estudo em células CHO-K1 submetidas a tratamento com 0,5 mM de H₂O₂ nos tempos de exposição de 1, 3, 6 e 12 horas não corroboram os achados dos autores acima citados. Uma possível explicação para esta diferença de resultados pode ser devido a diferenças na sensibilidade dos diversos tipos celulares utilizados.

A análise dos fenômenos de apoptose/necrose realizada no presente estudo indicou que as três concentrações de H₂O₂ avaliadas (1,5, 2 e 2,5 mM) foram capazes de induzir ambos os processos de morte. No entanto, houve uma relação inversa dose-resposta, ou seja, a frequência de células apoptóticas diminuiu com o aumento da concentração de H₂O₂. Em relação à necrose foi observado exatamente o inverso, isto é, com o aumento da concentração de H₂O₂ houve aumento concomitante de células necróticas. Estes dados corroboram os achados de Guenal et al.,²⁴ que observaram em fibroblastos embrionários, que o H₂O₂ induziu apoptose em concentrações mais baixas e necrose em concentrações mais elevadas. Resultados similares foram obtidos em células Jurkat²⁵ e em células pulpares humanas.²⁶ Fenech et al.²⁷ também observaram em linfócitos humanos o potencial indutor de necrose do peróxido de hidrogênio nas concentrações de 50 e 100 μM, mas não verificaram aumento significativo de células apoptóticas em nenhuma concentração testada. Estes autores sugerem que enquanto a apoptose desempenha um importante papel na eliminação de células com danos no material genético, a grande maioria das células danificadas morfológicamente parecem ser eliminadas por necrose. Deve-se ressaltar no entanto, que as concentrações avaliadas por todos estes trabalhos foram inferiores àquelas utilizadas no presente estudo.

A genotoxicidade do H₂O₂ também tem sido amplamente investigada nos últimos anos em diferentes tipos celulares. Segundo Benhusein et al.,²⁸ este composto é uma importante fonte de danos oxidativos, causando um amplo espectro

de lesões, incluindo quebras no DNA de fitas simples e duplas. Frenzilli et al.²⁹ observaram que este composto foi capaz de aumentar significativamente danos no DNA em leucócitos humanos. Neste estudo os autores empregaram concentrações de H₂O₂ (25, 50, 100 e 200 mM) maiores do que aquelas avaliadas no presente trabalho. Resultados similares foram observados na linhagem celular de carcinoma de hepatócitos (HepG2) por Benhusein et al.,²⁸ onde a genotoxicidade observada por estes autores foi dose e tempo dependente. Estes resultados contrariam aqueles observados em células CHO-K1 no presente trabalho, uma vez que o efeito genotóxico induzido pelo H₂O₂ em todas as concentrações avaliadas não foi dependente nem da dose e nem do tempo de exposição. Adicionalmente, Benhusein et al.²⁸ verificaram uma possível associação entre a genotoxicidade induzida pelo H₂O₂ e a ação de mecanismos de reparo do DNA. De acordo com estes autores, este composto induziu aumento significativo de danos no DNA na linhagem celular HepG2 em intervalos de tratamento que variaram de 5 minutos a 1 hora. Entretanto, após exposição das células por um período de 24 horas a extensão de danos no DNA observada não diferiu do controle negativo, sugerindo a ação de mecanismos de reparo do DNA. No presente estudo o H₂O₂ induziu aumento significativo na expressão destes dos genes *Tp53* e *Ercc1* na maior concentração avaliada (2,5 mM), sugerindo uma possível tentativa de reparar os danos no DNA.

A presença de danos no DNA induzidos por compostos genotóxicos como o H₂O₂, promove aumento nos níveis de expressão do gene *Tp53*³⁰⁻³² e, possivelmente, do seu produto proteico. Uma vez sintetizada, a proteína p53 é translocada para o núcleo onde atua como fator de transcrição para diferentes genes envolvidos nos mecanismos de bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose,³³ incluindo a ativação da expressão do gene *Ercc1*.³⁴ O produto proteico do gene *Ercc1* é essencial para a via de reparo por excisão de nucleotídeo e para exercer esta função, forma um complexo com a proteína Xpf, que contém um domínio catalítico com atividade de nuclease, enquanto a proteína *Ercc1* é necessária para sua ligação ao DNA e sua estabilização.³⁵ O heterodímero *Ercc1/Xpf* também está envolvido no reparo de quebras de fitas duplas de DNA e ligações cruzadas inter-cadeias (“*cross-link*”).³⁶ Tais alterações podem se originar de danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂.²⁸ No presente estudo foi constatado que a maior concentração de H₂O₂ avaliada (2,5mM) induziu aumento significativo na

expressão do gene *Erc1*, o mesmo não ocorrendo para o gene *Xpf*, que apresentou modulação negativa apenas na menor concentração avaliada (1,5 mM).

Apesar do reconhecido papel citotóxico e genotóxico do H₂O₂, até o presente momento há poucos estudos que avaliaram o efeito direto deste composto sobre a modulação da expressão gênica. Neste estudo observamos que os níveis de RNAm de três importantes genes associados a apoptose (*Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L*) aumentaram significativamente quando expostos a 2,5 mM de peróxido de hidrogênio.

O papel biológico desempenhado pelos produtos proteicos dos genes *Tp53*, *Bax* e *Bcl-x_L* na regulação da apoptose é bastante complexo. A proteína Bax é um monômero citosólico que, em resposta a estímulos pro-apoptóticos, muda sua conformação, se desloca e se integra à membrana mitocondrial externa, alterando sua permeabilidade e promovendo a liberação de proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo c. A liberação do citocromo c desencadeia a ativação da proteína caspase-9.³⁷ Sendo assim, a expressão aumentada do gene *Bax* promove morte celular por apoptose.

A proteína *Bcl-x_L* possui localização citosólica, mas em resposta a diferentes injúrias citotóxicas, associa-se fortemente à membrana mitocondrial externa.^{37,38} A inibição de apoptose promovida pela proteína *Bcl-x_L* se dá a partir do bloqueio da via mitocondrial,³⁹ pois de acordo com Huang et al.,⁴⁰ impede a translocação da proteína Bax para a membrana mitocondrial externa.

Em resposta a danos no DNA a proteína p53 é capaz de ativar a expressão de proteínas pró-apoptóticas, especialmente Bax e Bak.³² Vousden⁴¹ ressalta que a proteína p53 interfere na expressão de genes relacionados com as duas vias apoptóticas principais: a mitocondrial e a mediada por receptores de morte. Existem fortes evidências de que a proteína p53 atua como um fator de transcrição para o gene *Bax*.⁴² Geralmente quando a expressão do gene *Tp53* aumenta, a expressão do gene *Bax* também se eleva, mas a expressão do gene *Bcl-2* ou do gene pertencente à sua sub-família, o *Bcl-x_L*, diminui.⁴³

Min et al.⁴⁴ observaram que em células de câncer oral (HN4) e em queratinócitos imortalizados (IHOKs), o peróxido de hidrogênio foi capaz de induzir aumento na expressão das proteínas p53 e Bax, e de inibir a expressão da proteína Bcl-2. Os dados do presente estudo discordam parcialmente destes, pois foi

observado que a maior concentração (2,5 mM) do H₂O₂ também aumentou a expressão de *Bcl-x_L*, que atua de modo similar ao gene *Bcl-2*.^{45,46}

Deve-se ressaltar que muitos pesquisadores⁴⁷⁻⁵⁰ não têm apresentado dados da expressão dos genes *Bcl-2* e *Bax* individualmente, mas sim, resultados da razão (ou nível relativo da expressão) do heterodímero Bcl-2/Bax, que podem proteger ou induzir a apoptose, direcionando o destino final de uma célula.⁵¹ A explicação biológica que justifica o uso desta razão se deve ao comportamento das proteínas da subfamília anti-apoptótica Bcl-2, que podem formar heterodímeros com os membros da subfamília pró-apoptótica Bax. O destino final da célula depende da dimerização competitiva envolvendo os membros destas duas subfamílias. Quando o nível da expressão de Bcl-2 é mais elevado do que o nível de expressão de Bax, prevalece a formação de heterodímeros Bcl-2/Bax e a apoptose é evitada. Se, por outro lado, a proteína Bax é superexpressa, efeito oposto ocorre (formação de homodímero Bax/Bax) e as células sofrem a apoptose.^{37,45} Além disso, vale a pena mencionar que a relação envolvendo as proteínas p53, Bax e Bcl-2 (ou proteínas homólogas) não é simples, pois embora um sinal dado por altos níveis de p53 seja capaz de induzir um aumento na expressão do gene pró-apoptótico *Bax*, altos níveis de expressão do gene *Bcl-x_L* podem levar ao sequestro das proteínas Bax através da formação dos heterodímeros, bloqueando a apoptose.³²

Deste modo, mudanças na razão Bcl-2/Bax podem ser utilizadas como um possível fator indicativo da ocorrência de apoptose. Jung et al.⁴³ sugeriram que valores baixos desta razão demonstram a indução da apoptose, enquanto que valores altos indicam seu bloqueio. Nossos dados mostraram que a razão *Bcl-x_L*/Bax na maior concentração de H₂O₂ (2,5 mM) foi maior (1,01) do que aquela observada para a menor concentração (-1,64 em 1,5mM). Estes dados reforçam o índice de apoptose/necrose obtido no presente estudo, onde observamos claramente que à medida que a concentração de peróxido aumentava ocorria uma mudança no perfil de morte das células CHO-K1, ou seja, na menor concentração avaliada (1,5 mM) as células morriam principalmente por apoptose (razão *Bcl-x_L*/Bax baixa), enquanto que na concentração de 2,5 mM a necrose foi mais fortemente induzida (razão *Bcl-x_L*/Bax alta).

No presente estudo também foi avaliada a interferência do peróxido de hidrogênio na expressão de duas importantes proteínas envolvidas na apoptose,

caspase-8 e caspase-9. Nossos resultados revelaram que nas células CHO-K1 este composto foi capaz de modular negativamente a expressão do gene *Casp-9* apenas na menor concentração avaliada (1,5 mM). Estes dados contrariam os resultados obtidos por Wei e Zhou⁵² em células humanas de glândulas salivares, Min et al.⁴⁴ em células de câncer oral (HN4) e queratinócitos imortalizados (IHOKs) e Wu et al.²⁶ em células pulpares humanas (hDPC), que observaram que o H₂O₂ induziu a apoptose, preferencialmente, pela via mitocondrial a partir da ativação da proteína Caspase-9. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que, em células CHO-K1 a apoptose promovida pelo H₂O₂ ocorre através de outras caspases iniciadoras, diferentes da caspase-9. Adams⁵³ relata que a Caspase-12 desempenha um papel importante na iniciação da apoptose via estresse do retículo endoplasmático, enquanto que a caspase-2 também parece atuar como iniciadora da via mitocondrial. Min et al.⁴⁴ verificaram que o estresse do retículo endoplasmático também pode estar associado com a apoptose induzida pelo H₂O₂ em células de câncer oral (HN4) e queratinócitos imortalizados (IHOKs).

Outro gene avaliado neste estudo foi o *Top2*. Seu papel principal é regular o estado topológico da molécula de DNA durante a duplicação, transcrição e outros processos biológicos envolvendo o material genético, por meio de quebras e reuniões das cadeias de DNA.⁵⁴ Segundo Li et al.⁵⁵ este gene está envolvido tanto na proliferação como na morte celular. Muitos xenobióticos, incluindo aqueles envolvidos na formação de EROs como o H₂O₂, podem induzir a clivagem do DNA através da ativação da Topoisomerase 2, resultando na morte celular por apoptose.⁵⁵ No presente estudo não foi observado aumento na expressão do gene *Top2* em nenhuma das concentrações de H₂O₂ avaliadas. Apenas a menor concentração de H₂O₂ (1,5 mM) foi capaz de interferir na modulação da expressão deste gene, mas promovendo redução da expressão e não aumento. Estes resultados sugerem que em células CHO-K1 a apoptose induzida pelo H₂O₂ não envolve a ativação do gene *Top2*.

5. Conclusões

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que o H₂O₂ foi capaz de induzir severos efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células CHO-

K1, visto que em todas as concentrações avaliadas houve aumento significativo de morte celular. Adicionalmente, neste estudo também foi verificada a capacidade do H₂O₂ de modular a expressão de genes envolvidos em diferentes mecanismos biológicos, como apoptose, replicação e reparo do DNA. Dentre esses resultados destaca-se o aumento significativo na expressão do gene *Bcl-xL* que foi acompanhado pela mudança no perfil de morte induzido pelo H₂O₂, resultando na redução do número de células apoptóticas e aumento de células necróticas. Estes dados sugerem que em altas concentrações a forte toxicidade deste composto promove danos celulares irreparáveis resultando em morte por necrose. Além disso, o perfil transcricional obtido no presente estudo dos genes envolvidos na indução de apoptose (*casp-8* e *casp-9*), não permitiu determinar qual via apoptótica foi desencadeada pelo H₂O₂ em células CHO-K1. Portanto, são necessários novos estudos que avaliem outros genes envolvidos na apoptose induzida pelo H₂O₂ e que contribuam para um melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na toxicidade deste composto.

Referências

1. Demarco FF, Meireles SS, Sarmiento HR, Dantas RVF, Botero T, Tarquinio SBC. Erosion and abrasion on dental structures undergoing at-home bleaching. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* 2011;**3**:45–52.
2. Li Y. Safety Controversies in Tooth Bleaching. *Dental Clinics of North America* 2011;**55**:255–263.
3. Oliveira MAVC, Quagliatto OS, Magalhães D, Biffi JCG. Effects of bleaching agents and adhesive systems in dental pulp: a literature review. *Brazilian Journal Oral Sciences* 2012;**11(4)**:428-432.
4. Soares DG, Ribeiro APD, Vargas FS, Hebling J, Costa CAS. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clinical Oral Investigations* 2013;**17**:1901–1909.
5. Soares DG, Pastana JV, Duque CC, Ribeiro AP, Basso FG, Hebling J, et al. Influence of Adhesive Restorations on Diffusion of H₂O₂ Released from a Bleaching Agent and Its Toxic Effects on Pulp Cells. *The Journal of Adhesive Dentistry* 2014; **16(2)**:123-128.
6. Fernandez MR, Carvalho RV, Ogliari FA, Beira FA, Etges A, Bueno M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. *International Endodontic Journal* 2010;**43**:102–108.
7. Meireles SS, Fontes ST, Coimbra LAA, Bona AD, Demarco FF. Effectiveness of different carbamide peroxide concentrations used for tooth bleaching: an in vitro study. *Journal of Applied Oral Science* 2012;**20(2)**: 186-191.
8. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review, *Clinical Oral Investigations* 2010;**14(1)**:1-10.
9. Hannig C, Zech R, Henze E, Dorr-Tolui R, Attin T. Determination of peroxides in saliva—kinetics of peroxide release into saliva during home-bleaching with Whitestrips and Vivastyle. *Archives Oral Biology* 2003;**48**:559–566.

10. Junqueira R, Binato R, Carvalho RF, Carmo AMR, Devito KL, Rodrigues SSMFG, et al. In vitro Analysis of Enamel Microhardness as Subjected to Prolonged Use of External Bleaching Agents, *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde* 2013; **15(2)**: 141-143.
11. Ribeiro DA, Scolastici C, Marques MEA, Salvadori DMF. Fluoride does not induce DNA breakage in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Brazilian Oral Research* 2004;**18(3)**:192-196.
12. Chang H-H, Chang M-C, Lin L-D, Lee J-J, Wang T-M, Huang C-H, et al. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials* 2010;**31**:6917-6925.
13. Bahr SM, Borgschulte T, Kayser KJ, Lin N. Using Microarray Technology to Select Housekeeping Genes in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering* 2009;**104**:1041–1046.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal Immunological Methods* 1983;**65(1-2)**:55-63.
15. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *Journal of Dental Research* 1993;**72**:931–938.
16. Min KS, Lee H-J, Kim S-H, Lee S-K, Kim H-R, Pae H-O, et al. Hydrogen peroxide induces Heme Oxygenase-1 and Dentin Sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *Journal of Endodontics* 2008a;**34(8)**:983-989.
17. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984;**123**:291-298.
18. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988;**175**:184-191.
19. Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *Meeker-McLeod-Sibley Community* 1995;**3**:103-115.
20. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboudi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *In vitro*. In: Schurartz LM, Osbourne BA, editors. *Methods in Cell Biology*. Academic Press 46: 1995. p.153-184.
21. Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 2012;**33**:366–369.
22. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 2002;**30**:e36.
23. Carrasco LD, Fröner IC, Corona SAM, Pécora JD. Effect of internal bleaching agentes on dentinal permeability of non-vital teeth: quantitative assessment. *Dental Traumatology* 2003;**19**:85-89.
24. Guéna I, Fraisse CS, Gaumer S, Mignotte B. Bcl-2 and Hsp27 act at different levels to suppress programmed cell death. *Oncogene* 1997;**15**:347-360.
25. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, et al. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Research* 2006;**40**:619–630.
26. Wu T-t, Li L-f, Du R, Jiang L, Zhu YQ. Hydrogen Peroxide Induces Apoptosis in Human Dental Pulp Cells via Caspase-9 Dependent Pathway. *Journal of Endodontics* 2013;**39(9)**:1151-1155.
27. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 1999;**14(6)**:605-612.

28. Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S, Williams FM. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine* 2010;**5**:1-6.
29. Frenzilli G, Bosco E, Barale R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutation Research* 2000;**468**:93–108.
30. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation* 2003;**10**:431–442.
31. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. p53 is a Tumor Suppressor Gene. *Cell* 2004;**116**:67-69.
32. Bogdał MN, Hat B, Kochanczyk M, Lipniacki T. Levels of pro-apoptotic regulator Bad and anti-apoptotic regulator Bcl-xL determine the type of the apoptotic logic gate. *BioMed Central Systems Biology* 2013;**7**:1-17.
33. Suzuki K, Matsubara H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011;**2011**:1-7.
34. Núñez F, Chipchase MD, Clarke AR, Melton DW. Nucleotide excision repair gene (ERCC1) deficiency causes G2 arrest in hepatocytes and a reduction in liver binucleation: the role of p53 and p21. *FASEB Journal* 2000;**14**:1073–1082.
35. Ahmad A, Robinson A R, Duensing A, Drunen EV, Beverloo HB, Weisberg DB, et al. ERCC1-XPF Endonuclease Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 2008;**28(16)**:5082–5092.
36. Kirschner K, Melton DW. Multiple Roles of the ERCC1-XPF Endonuclease in DNA Repair and Resistance to Anticancer Drugs. *Anticancer Research* 2010;**30**:3223-3232.
37. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2002;**2**:647-656.
38. Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;**22**:8590–8607.
39. Zhao WL, Daneshpouy ME, Mounier N, Brière J, Leboeuf C, Plassa LF, et al. Prognostic significance of *Bcl-x_L* gene expression and apoptotic cell counts in follicular lymphoma. *Blood Journal* 2004;**103**:695-697.
40. Huang F-M, Tsai C-H, Ding S-J, Chang Y-C. Induction of cyclooxygenase-2 expression in human pulp cells stimulated by dentin bonding agents. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2005;**100(4)**:501-506.
41. Vousden KH. p53: death star. *Cell* 2000;**103(5)**:691-964.
42. Miyashita T, Reed JC. Tumor Suppressor p53 is a Direct Transcriptional Activator of the Human *Bax* Gene. *Cell* 1995;**80**:293-299.
43. Jung H, Seok SH, Han JH, Abdelkader TS, Kim TH, Chang SN, et al. Effect of fluorescent whitening agent on the transcription of cell damage-related genes in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology* 2012;**32**:654–661.
44. Min SK, Lee SK, Park JS, Lee J, Paeng JY, Lee SI, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in hydrogen peroxide induced apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2008b;**37**:490–498.
45. Polverini PJ, Nor, JE. Apoptosis and predisposition to oral cancer. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1999;**10(2)**:139-152.
46. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007;**26**:1324–1337.
47. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br. Journal of Cancer* 1997;**76(7)**:935–938.
48. Pavlovic V, Cekic S, Kocic G, Sokolovic D, Zivkovic V. Effect of monosodium glutamate on apoptosis and bcl-2/bax protein level in rat thymocyte culture. *Physiological Research* 2006;**56**:616–626.
49. Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzlepi V, et al. Increased Bax/Bcl2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo* 2007;**21(1)**:123–132.

50. Jin Y, Zheng S, Pu Y, Shu L, Sun L, Liu W, et al. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 2011;**82(3)**:398–404.
51. Korsmeyer, SJ. Regulators of cell death. *Trends in Genetics* 1995;**11**:101-105.
52. Wei BJ, Zhou ZT. Hydrogen peroxide induced apoptosis in SV-40 transformed human salivary gland acinar cells. *Oral Oncology* 2007;**43**:248–51.
53. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development* 2003;**17**:2481–2495.
54. Wang, JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 2002;**3**:430-440.
55. Li TK, Chen AY, Yu C, Mao Y, Wang H, Liu LF. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. *Genes & Development* 1999;**13**:1553–1560.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inúmeros estudos revelaram nos últimos anos que os monômeros HEMA e TEGDMA e o agente clareador H_2O_2 são potencialmente tóxicos para diversos tipos celulares, podendo interferir na homeostasia celular, causando danos ao material genético, bloqueio de ciclo celular e induzindo a apoptose. Entretanto, com relação aos efeitos biológicos do uso de TFEMA na composição de materiais dentários, até o presente momento não existem dados na literatura que confirmem ou descartem a capacidade deste composto de promover danos celulares.

No presente estudo verificamos que todos os compostos avaliados foram capazes de induzir severos efeitos citotóxicos, reduzindo significativamente a viabilidade das células CHO-K1. Com respeito à genotoxicidade dos materiais aqui testados, observamos que o H_2O_2 promoveu efeito genotóxico em todas as concentrações avaliadas, enquanto que os monômeros de metacrilatos apenas nas maiores concentrações testadas. Tais resultados confirmam a hipótese de que o TFEMA apresenta potencial citotóxico e genotóxico em células CHO-K1, além de apresentar um potencial citotóxico maior do que aquele observado para o HEMA e o TEGDMA.

A capacidade de induzir apoptose foi observada para todos os materiais dentários avaliados neste estudo, entretanto apenas o HEMA, o TFEMA e o H_2O_2 aumentaram significativamente o número de células necróticas nas maiores concentrações estudadas.

As análises de expressão gênica não permitiram inferir seguramente sobre o envolvimento dos genes *Tp53*, *Bax*, *Bcl-x_L*, *Casp-8*, *Casp-9*, *Ercc1*, *Xpf* e *Top2* na toxicidade dos materiais dentários aqui avaliados, visto que apenas o TEGDMA e o H_2O_2 foram capazes de interferir significativamente na expressão de alguns destes genes.

A partir do perfil transcricional obtido no presente estudo, não foi possível determinar qual via apoptótica foi desencadeada pelos compostos testados em células CHO-K1. Novos estudos avaliando outros genes envolvidos na apoptose induzida pelos monômeros de metacrilato e H_2O_2 e utilizando outras linhagens celulares e concentrações mais baixas podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na regulação deste processo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes & Development**, v. 17, p. 2481–2495, 2003.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2-regulated apoptosis switch: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**, v. 19(5), p. 488–496, 2007a.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, 1324–1337, 2007b.
- AHMAD, A.; ROBINSON, A. R.; DUENSING, A.; DRUNEN, E.V.; BEVERLOO, H.B.; WEISBERG, D.B.; HASTY, P.; HOEIJMAKERS, J.H.L; NIEDERNHOFER, L.J. *ERCC1-XPF* Endonuclease Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28(16), p. 5082–5092, 2008.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1054p.
- ALFREDSSON, J.; PUTHALAKATH, H.; MARTIN, H.; STRASSER, A.; NILSSON, G. Proapoptotic Bcl-2 family member Bim is involved in the control of mast cell survival and is induced together with Bcl-XL upon IgE-receptor activation. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 136–144, 2005.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1(1), p. 37-58, 2007.
- ANUSAVICE, K. **Phillips, Materiais dentários**. 11ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 764 p.
- ARANDA, P.S.; LAJOIE, D.M.; JORCYK, C.L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, v. 33, p. 366–369, 2012.
- BAHR, S.M.; BORGSCHULTE, T.; KAYSER, K.J.; LIN, N. Using Microarray Technology to Select Housekeeping Genes in Chinese Hamster Ovary Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 1041–1046, 2009.
- BAKOPOULOU, A.; MOURELATOS, D.; TSIFTSOGLU, A.S.; GIASSIN, N.P.; MIOGLOU, E.; GAREFIS, P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 672, p. 103–112, 2009.
- BAKOPOULOU, A.; PAPADOPOULOS, T.; GAREFIS, P. Molecular Toxicology of Substances Released from Resin–Based Dental Restorative Materials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3861-3899, 2009.
- BAKOPOULOU, A.; LEYHAUSEN, G; VOLK, J.; TSIFTSOGLU, A.; GAREFIS, P.; KOIDIS, P.; GEURTSSEN, W. Effects of HEMA and TEDGMA on the *in vitro* odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. **Dental Materials**, v. 27, p. 608-617, 2011.
- BECHER, R.; KOPPERUD, H.M.; AL, R.H.; SAMUELSEN, J.T.; MORISBAK, E.; DAHLMAN, H.J.; LILLEAAS, E.M.; DAHL, J.E. Pattern of cell death after *in vitro*

- exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. **Dental Materials**, v.22, p. 630-640, 2006.
- BENHUSEIN, G.M.; MUTCH, E.; ABURAWI, S.; WILLIAMS, F.M. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. **Libyan Journal of Medicine**, v. 5, p. 1-6, 2010.
- BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; MASCIO, P.D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29(6): p. 1340-1344, 2006.
- BESSE, B.; OLAUSSEN, K.A.; SORIA, J-C. ERCC1 and RRM1: Ready for Prime Time? **Journal of Clinical Oncology**, 31 (8): 1050-1060, 2013.
- BIANCHI, L.; RIBEIRO, A.P.D.; CARRILHO, M.R.O.; PASHLEY, D.H.; COSTA, C.A.S.; HEBLING, J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 00B, p. 000–000, 2013.
- BLASIAK, J.; SYNOWIEC, E.; TARNAWSKA, J.; CZARNY, P.; POPLAWSKI, T.; REITER, R.J. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 7487–7496, 2012.
- BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725-31, 2003.
- BOGDAŁ, M.N.; HAT, B.; KOCHANCZYK, M.; LIPNIACKI, T. Levels of pro-apoptotic regulator Bad and anti-apoptotic regulator Bcl-xL determine the type of the apoptotic logic gate. **BioMed Central Systems Biology**, v. 7, p.1-17, 2013.
- BORTOLATTO, J.F.. **Sensibilidade dolorosa e efetividade do clareamento dental de consultório**. 2011. 95 p. Dissertação (Mestre em Ciências Odontológicas.) UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO. Araraquara. 2011.
- BOUILLAGUET, S.; WATAHA, J.C.; HANKS, C.T.; CIUCCHI, B.; HOLZ, J. *In Vitro* Cytotoxicity and Dentin Permeability of HEMA. **Journal of Endodontics**, v. 22(5), p. 244-248, 1996.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169–193, 2000.
- BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15(3), p. 155-66, 2004.
- CARRASCO, L.D.; FRÖNER, I.C.; CORONA, S.A.M.; PÉCORA, J.D. Effect of internal bleaching agents on dentinal permeability of non-vital teeth: quantitative assessment. **Dental Traumatology**, v. 19, p. 85-89, 2003.
- CAVIEDES-BUCHELI, J.; ARIZA-GARCÍA, G.; RESTREPO-MÉNDEZ, S.; RÍOS-OSORIO, N.; LOMBANA, N.; MUÑOZ, H.R. The effect of tooth bleaching on

substance P expression in human dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 34(12), p. 1462-5, 2008.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHANG, M.C.; LIN, L.D.; CHAN, C.P.; CHANG, H.H.; CHEN, L.I.; LIN, H.J.; YEH, H.W.; TSENG, W.Y.; LIN, P.S.; LIN, C.C.; JENG, J.H. The effect of BisGMA on cyclooxygenase-2 expression, PGE production and cytotoxicity via reactive oxygen species- and MEK/ERK-dependent and independent pathways. **Biomaterials**, v. 30, p. 4070-4077, 2009.

CHANG, H-H.; CHANG, M-C.; LIN, L-D.; LEE, J-J.; WANG, T-M.; HUANG, C-H.; YANG, T-T.; LIN, H-J.; JENG, J-H. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. **Biomaterials**, v. 31, p. 6917-6925, 2010.

CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G.K. Caspases – An update. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151 (Issue 1), p. 10-27, 2008.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 647-656, 2002.

CORY, S.; HUANG, D.C.S.; ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v. 22, p. 8590–8607, 2003.

CRAIG, R.G.; POWERS, J.M. **Materiais dentários restauradores**. 11^a. ed. São Paulo: Santos livraria e editora, 2006. 704 p.

CRAIG, R.G.; POWERS, J.M.; WATAHA, J.C. **Materiais dentários: propriedades e manipulação**. 7^a. ed. São Paulo: Santos livraria e editora, 2002. 327 p.

DEMARCO, F.F.; MEIRELES, S.S.; SARMENTO, H.R.; DANTAS, R.V.F.; BOTERO, T.; TARQUINIO, S.B.C. Erosion and abrasion on dental structures undergoing at-home bleaching. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 3, p. 45–52, 2011.

DEMIRCI, M.; HILLER, K-A; BOSL, C; GALLER, K; SCHMALZ, G & SCHWEIKL, H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. **Dental materials**, v. 24, p. 362-371, 2008.

DJAVAHERI-MERGNY, M.; JAVELAUD, D.; WIETZERBIN, J.; BESANCON, F. NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. **FEBS Letters**, v. 578, p. 111-115, 2004.

DURNER, J.; WALTHER, U.I.; ZASPEL, J.; HICKEL, R.; REICHL, F.X. Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells. **Biomaterials**, v. 31, p. 818–823, 2010.

ECKHARDT, A.; GERSTMAYR, N.; HILLER, K.A.; BOLAY, C.; WAHA, C.; SPAGNUOLO, G.; CAMARGO, C.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. **Biomaterials**, v. 30, p. 2006–2014, 2009.

EDUARDO, J.V.P. Materiais Macios Usados em Base de Prótese Total para Reembasamento Direto e Indireto. **Revista da APCD**, v. 51(6), p. 531-33, 1997.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14(6), p. 605-612, 1999.

FERNÁNDEZ, M.R.; CARVALHO, R.V.; OGLIARI, F.A.; BEIRA, F.A.; ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. **International Endodontic Journal**, v. 43, p. 102–108, 2010.

FORTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171 - 177, 2006.

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research**, v. 468, p. 93–108, 2000.

GALLUZZI, L.; VITALE, V.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H-U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107–120, 2012.

GOLDBERG, M.; GROOTVELD, M.; LYNCH, E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review, **Clinical Oral Investigations**, v. 14(1), 1-10, 2010.

GONTIJO, Á.M.M.C.I.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, Lucia Regina; SALVADORI, Daisy Maria Fávero; MARQUES, EDMUNDO KANAN. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003. p. 247-279.

GOYATÁ, F.R.; GONÇALVEZ, P.A.M.; BELLO, R.F.; FERREIRA, N.G.; FERREIRA, T.G.; COELHO, S.M.O. Avaliação quantitativa de microrganismo orais em materiais reembasadores de prótese total. **International Journal Dentistry**, v. 8(2), 79-81, 2009.

GREGSON, K.S.; TERRENCE O'NEILL, J.; PLATT, J.A.; WINDSOR, L. J. In vitro induction of hydrolytic activity in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol dimethacrylate and monocyte chemotactic protein-1. **Dental materials**, v. 24, p. 1461–1467, 2008.

GUÉNAL, I.; FRAISSE, C.S.; GAUMER, S.; MIGNOTTE, B. Bcl-2 and Hsp27 act at different levels to suppress programmed cell death. **Oncogene**, v. 15, p. 347-360, 1997.

HANKS C.T.; FAT, J.C.; WATAHA J.C.; CORCORAN, J.F. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. **Journal of Dental Research**, v. 72 p. 931–938, 1993.

HANNIG, C.; ZECH, R.; HENZE, E.; DORR-TOLUI, R.; ATTIN, T. Determination of peroxides in saliva—kinetics of peroxide release into saliva during home-bleaching with Whitestrips and Vivastyle. **Archives Oral Biology**, v. 48, p. 559–566, 2003.

HUANG, F-M.; TSAI, C-H.; DING, S-J.; CHANG, Y-C. Induction of cyclooxygenase-2 expression in human pulp cells stimulated by dentin bonding agents. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 100(4), p. 501-506, 2005.

HUANG, F.M.; LI, Y.C.; LEE, S.S.; CHANG, Y.C. Cytotoxicity of dentine bonding agents on human pulp cells is related to intracellular glutathione levels. **International Endodontic Journal**, v. 43, p. 1091–1097, 2010.

JORGE, J.H.; GIAMPAOLO, E.T.; PAVARINA, .C. Citotoxicidade dos Materiais Dentários. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 33(2), p. 65-68, 2004.

JIN, Y.; ZHENG, S.; PU, Y.; SHU, L.; SUN, L.; LIU, W.; FU, Z. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 82(3), p. 398–404, 2011.

JUNG, Y.J.; HYUN, H.K.; KIM, Y.J.; JANG, K.T. Effect of collagenase and esterase on resin-dentin interface: a comparative study between a total-etch adhesive and a self-etch adhesive. **American Journal Dentistry**, v. 22, p. 295–298, 2009.

JUNG, H.; SEOK, S.H.; HAN, J.H.; ABDELKADER, T.S.; KIM, T.H.; CHANG, S.N.; KO, A.S.; CHOI, S.K.; LEE, S.K.; SEO, J.E.; BYUN, S.H.; KIM, J.A.; PARK, J.H. Effect of fluorescent whitening agent on the transcription of cell damage-related genes in zebrafish embryos. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p. 654–661, 2012.

JUNQUEIRA, R.; BINATO, R.; CARVALHO, R.F.; CARMO, A.M.R.; DEVITO, K.L.; RODRIGUES, S.S.M.F.G.; SALVIO, L.A. In vitro Analysis of Enamel Microhardness as Subjected to Prolonged Use of External Bleaching Agents, **UNOPAR Científica Ciências Biológica e da Saúde**, v. 15(2), p. 141-143, 2013.

KADOMA, Y.; TAMAKI, Y. Bonding durability against water of a fluorine-containing resin for precious metal alloys. **Dental Materials Journal**, v. 28(5), p. 642–648, 2009.

KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nature Immunology**, v. 3, p. 221-227, 2002.

KARLEN, Y.; MCNAIR, A.; PERSEGUERS, S.; MAZZA, C.; MERMOD, N. Statistical significance of quantitative PCR. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 131, 2007.

KASUGA, Y.; AKIBA, N.; MINAKUCHI, S.; UCHIDA, T.; MATSUSHITA, N.; HISHIMOTO, M.; HAYAKAWA, I. Development of soft denture lining materials containing fluorinated monomers. **Journal Japan Prosthodontic Society**, v. 52, p. 183-188, 2008.

KIRSCHNER, K.; MELTON, D.W. Multiple Roles of the ERCC1-XPF Endonuclease in DNA Repair and Resistance to Anticancer Drugs **Anticancer Research**, v. 30, p. 3223-3232, 2010.

KLEINSASSER, N.H.; WALLNER, B.C.; HARREUS, U.A.; KLEINJUNG, T.; FOLWACZNY, M.; HICKEL, R.; KEHE, K.; REICHL, F-X. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **Journal of Dentistry**, v. 32, p. 229-234, 2004.

KLEINSASSER, N.H.; SCHMID, K.; SASSEN, A.W.; HARRÉUS, U.A.; STAUDENMAIER, R.; FOLWACZNY, M.; GLAS, J.; REICHL, F-X. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. **Biomaterials**, v. 27, p. 1762–1770, 2006.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **Meeker-McLeod-Sibley Community**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KOPPERUD, H.M.; KLEVEN, I.S.; WELLENDORF, H. Identification and quantification of leachable substances from polymer-based orthodontic base-plate materials. *European Journal of Orthodontics*, v. 33, p. 26–31, 2011.

KORSMEYER, S.J. Regulators of cell death. **Trends in Genetics**, v. 11, p. 101-105, 1995.

KRIFKA, S.; PETZEL, C.; HILLER, K.A.; FRANK, E.M.; BOSL, C.; SPAGNUOLO, G.; REICHL, F.X.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. **Biomaterials**, v. 31, p. 2964–2975, 2010.

KRIFKA, S.; PETZEL, C.; BOLAY, C.; HILLER, K-A.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. Activation of stress-regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. **Biomaterials**, v. 32, p. 1787-1795, 2011.

KRIFKA, S.; HILLER, K.A.; SPAGNUOLO, G.; JEWETT, A.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). **Biomaterials**, v. 33, p. 5177-5186, 2012a.

KRIFKA, S.; HILLER, K-A.; BOLAY, C.; PETZEL, C.; SPAGNUOLO, G.; REICHL, F-X.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. Function of MAPK and downstream transcription factors in monomer-induced apoptosis. **Biomaterials**, v. 33, p. 740-750, 2012b.

KRIFKA, S., SPAGNUOLO, G., SCHMALZ, G., SCHWEIKL, H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. **Biomaterials**, v. 34, p. 4555-4563, 2013.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; HERDE, K.D.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

KULAK, Y.; ARIKAN, A.; KAZAZOGLUE, E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. **Journal Oral Rehabilitation**, v. 24, p. 788-790, 1997.

LAMKANFI, M.; FESTJENS, N.; DECLERCQ, W.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 44–55, 2007.

LANDA, F.V.; GOYATÁ, F.R.; HESPANHOL, F.L.; DIAS, A.L.; CUNHA, L.G.; GONÇALVES, P.A.; SANTOS, V.R. Influência da aplicação do glaze na rugosidade superficial de três materiais reembasadores. **International Journal Dentistry**, v. 8(3), p. 124-127, 2009.

LEE, D.H.; LIM, B.S.; LEE, Y.K.; AHN, S.J.; YANG, H.C. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. **Dental materials**, v. 22, p.1086–1092, 2006.

LEFEUVRE, M.; AMJAAD, W.; GOLDBERG, M.; STANISLAWSKI, L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. **Biomaterials**, v. 26, p. 5130–5137, 2005.

LEVINE, A.J.; FINLAY, C.A.; HINDS, P.W. p53 is a Tumor Suppressor Gene. **Cell**, v. 116, p. 67-69, 2004.

LI, Y. Safety Controversies in Tooth Bleaching. **Dental Clinics North America**, v. 55, p. 255–263, 2011.

LI, T-K.; CHEN, A.Y.; YU, C.; HUIMIN WANG, Y.M.; LIU, L.F. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. **Genes & Development**, v. 13, p. 1553-1560, 1999.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology. 4th edition**. New York: W. H. Freeman. 2000.

MAHANEY, B.L.; MEEK, K.; LEES-MILLER, S.P. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 639–650, 2009.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M.R. Measurements of chemical carcinogen-induced sister-chromatid exchanges in a whole organ *in vitro*. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147(4), p. 165-169, 1985.

MARTIN, L.P.; HAMILTON, T.C.; SCHILDER, R.J. Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 14(5), p. 1291-1295, 2008.

MAVROGONATOU, E.; ELIADES, T.; ELIADES, G.; KLETSAS, D. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on p53-dependent G2 arrest in human gingival fibroblasts. **Biomaterials**, v. 31, p. 8530-8538, 2010.

McATEER, J. A.; DAVIS, J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: **Basic Cell Culture: A Practical Approach** (J. M. Davis, Ed.), pp. 122–132. IRL Press, Oxford, U.K. 1994.

MCGAHON, A. J., MARTIN, S. J., BISSONNETTE, R. P., MAHBOUDI, A., SHI, Y., MOGIL, R. J., NISHIOKA, W. K., GREEN, D. R. The end of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *In vitro*. In: **Methods in Cell Biology**. L. M. Schurartz, B. A. Osbourne (Eds), Academic Press 46: 153-184. 1995.

MCMILLAN, D.A.; MAHONY, C.; PATEL, L.B.; ZHOU, X.; BAILEY, R.E.; WALDEN, G.L. Salivary peroxide kinetics with 6% hydrogen peroxide the depletion of the cells GSH pool due to TEGDMA is caused whitening strips. **Journal of Dental Research**, v. 82, p. 1046 (special issueB), 2003.

MEIRELES, S.S.; FONTES, S.T.; COIMBRA, L.A.A.; BONA, A.D.; DEMARCO, F.F. Effectiveness of different carbamide peroxide concentrations used for tooth bleaching: an *in vitro* study. **Journal Applied Oral Science**, v. 20(2), p. 186-191, 2012.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor Suppressor p53 is a Direct Transcriptional Activator of the Human *Bax* Gene. **Cell**, v. 80, p. 293-299, 1995.

MIN, K.S.; LEE, H-J.; KIM, S-H.; LEE, S-K.; KIM, H-R.; PAE, H-O.; CHUNG, H-T.; SHIN, H-I.; LEE, S-K.; KIM, E-C. Hydrogen peroxide induces Heme Oxygenase-1 and Dentin Sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 34 (8), p. 983-989, 2008a.

MIN, S.K.; LEE, S.K.; PARK, J.S.; LEE, J.; PAENG, J.Y.; LEE, S.I.; LEE, H.J.; KIM, Y.; PAE, H.O.; LEE, S.K.; KIM, E.C. Endoplasmic reticulum stress is involved in hydrogen peroxide induced apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, p. 490–498, 2008b.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal Immunological Methods**, v. 65(1-2), p. 55-63, 1983.

NACCARATI, A.; POLAKOVA, V.; PARDINI, B.; VODICKOVA, L.; HEMMINKI, K.; KUMAR, R.; VODICKA, P. Mutations and polymorphisms in TP53 gene—an overview on the role in colorectal cancer. **Mutagenesis**, v. 27(2), p. 211–218, 2012.

NODA, M.; WATAHA, J.C.; KAGA, M.; LOCKWOOD, P.E.; VOLKMANN; K.R.; SANO, H. Components of dentinal adhesives modulate Heat Shock Protein 72 expression in Heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. **Journal of Dental Research**, v. 81(4), p. 265-269, 2002.

NODA, M.; WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; VOLKMANN, K.R.; KAGA, M.; SANO, H. Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF- α secretion of THP-1 monocytes. **Dental materials**, v. 19, p. 101-105, 2003.

NÚÑEZ, F.; CHIPCHASE, M.D.; CLARKE, A.R.; MELTON, D.W. Nucleotide excision repair gene (ERCC1) deficiency causes G2 arrest in hepatocytes and a reduction in liver binucleation: the role of p53 and p21. **FASEB Journal**, v. 14, p.1073–1082, 2000.

OHL, F.; JUNG, M.; XU, C.; STEPHAN, C.; RABIEN, A.; BURKHARDT, M.; NITSCHKE, A.; KRISTIANSEN, G.; LOENING, S.A.; RADONIĆ, A.; JUNG, K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? **Journal of Molecular Medicine**, 83:1014-1024, 2005.

OLIVEIRA, D.V.N.P. **Avaliação da expressão de genes processadores de danos oxidativos em pacientes com Alzheimer**. Dissertação – USP. São Paulo, 2007. 73 p.

OLIVEIRA, M.A.V.C.P.; QUAGLIATTO, S.; MAGALHÃES, D.; BIFFI, J.C.G. Effects of bleaching agents and adhesive systems in dental pulp: a literature review. **Brazilian Journal Oral Sciences**, v. 11(4), p. 428-432, 2012.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 431–442, 2003.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PARANJPE, A.; CACALANO, N.A.; HUME, W.R.; JEWETT, A. Mechanisms of N-acetyl Cysteine-mediated Protection from 2-Hydroxyethyl Methacrylate-induced Apoptosis. **Journal of Endodontics**, v. 34, p. 1191–1197, 2008.

PARK, J.G.; YE, Q.; TOPP, E.M.; KOSTORYZ, E.L.; WANG, Y.; KIEWEG, S.L.; SPENCER, P. Preparation and properties of novel dentin adhesives with esterase resistance. **J of Applied Polymer Science**, v. 107, p. 3588–3597, 2008.

PAVLOVIC, V.; CEKIC, S.; KOCIC, G.; SOKOLOVIC, D.; ZIVKOVIC, V. Effect of monosodium glutamate on apoptosis and bcl-2/bax protein level in rat thymocyte culture. **Physiological Research**, v. 56, p. 616–626, 2006.

PAWLOWSKA, E.; POPLAWSKI, T.; KSIAZEK, D.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. **Mutation Research**, v. 696, p. 122–129, 2010.

PEPPER, C.; HOY, T.; BENTLEY, D.P. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with *in vitro* apoptosis and clinical resistance. **Br. Journal of Cancer**, v. 76(7), p.935–938, 1997.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PIETSCH, E.C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M.E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v. 25, p. 1602–1611, 2006.

PFAFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002–2007, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 9-36, 2002.

POLVERINI, P.J.; NOR, J.E. Apoptosis and predisposition to oral cancer. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 10(2), p. 139-152, 1999.

POVIRK, L.F. Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks. **DNA Repair**, v. 5, p. 1199–212, 2006.

POWERS, J.M.; SAKAGUCHI, R.L. **Craig's Restorative dental materials**. 20th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier: 2006. 632 p.

REICHL, F.X.; DURNER, J.; HICKEL, R.; KUNZELMANN, K.H.; JEWETT, A.; WANG, M.Y. Distribution and excretion of TEGDMA in guinea pigs and mice. **Journal of Dental Research**, v. 80, p. 1412–1415, 2001.

RIBEIRO, L.R.; SALVATORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 2003. 356p.

RIBEIRO, D.A.; SCOLASTICI, C.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. Fluoride does not induce DNA breakage in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. **Brazilian Oral Research**, v. 18(3), p. 192-196, 2004.

RIBEIRO, D.A.; MARQUES, M.E.A.; SALVAD, D.M.F. Study of damage induced by dental bleaching agents *in vitro*. **Brazilian oral research**, v. 20(1), p. 47-51, 2006.

RIBEIRO, D. Single-Cell Gel (Comet) Assay as a Promising Tool for the Detection of DNA Damage Induced by Compounds Used in Dental Practice: **The Oral Cancer Risk Assessment. Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 14(2-3), p. 165–175, 2008.

RUNDELL, MARK S.; WAGNER, ELIZABETH D.; PLEWA, MICHAEL J. The Comet Assay: Genotoxic Damage or Nuclear Fragmentation? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, p. 61–67, 2003.

RYAN, K.M.; PHILLIPS, A.C.; VOUSDEN, K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 332–337, 2001.

SAITO, Y.; NISHIO, K.; OGAWA, Y.; KIMATA, J.; KINUMI, T.; YOSHIDA, Y.; NOGUCHI, N.; NIKI, E. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. **Free Radical Research**, v. 40, p. 619–630, 2006.

SALAKOU, S.; KARDAMAKIS, D.; TSAMANDAS, A.C.; ZOLOTA, V.; APOSTOLAKIS, E.; TZLEPI, V.; PAPATHANASOPOULOS, P.; BONIKOS, D.S.; PAPAPETROPOULOS, T.; PETSAS, T.; DOUGENIS, D. Increased Bax/Bcl2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. **In Vivo**, v. 21(1), p. 123–132, 2007.

SAMUELSEN, J.T.; DAHL, J.E.; KARLSSON, S.; MORISBAK, E.; BECHER, R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. **Dental Materials**, v. 23, p. 34–39, 2007.

SAMUELSEN, J.T.; HOLME, J.A.; BECHER, R.; KARLSSON, S.; MORISBAK, E.; DAHL, J.E. HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis *in vitro*. **Dental materials**, v. 24, p. 134–140, 2008.

SASAKI, Y.F.; NAKAMURA, T.; KAWAGUCHI, S. What is better experimental design for *in vitro* comet assay to detect chemical genotoxicity? **Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences**, p. 499-504, 2007.

SCHWEIKL, H.; ALTMANNBERGER, I.; HANSER, N.; HILLER, K.A.; BOLAY, C.; BROCKHOFF, G.; SPAGNUOLO, G.; GALLER, K.; SCHMALZ, G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. **Biomaterials**, v. 26, p. 4111–4118, 2005.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **Journal Dentistry Research**, v. 85, p. 870–877, 2006.

SCHWEIKL, H.; HARTMANN, A.; HILLER, K-A.; SPAGNUOLO, G.; BOLAY, C.; BROCKHOFF, G.; SCHMALZ, G. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. **Dental materials**, v. 23, p. 688–695, 2007.

SCHWEIKL, H.; HILLER, K-A.; ECKHARDT, A.; BOLAY, C.; SPAGNUOLO, G.; STEMPFL, T.; SCHMALZ, G. Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. **Biomaterials**, v. 29, p. 1377-1387, 2008.

SCHWEIKL, H.; PETZEL, C.; BOLAY, C.; HILLER, K-A.; BUCHALLA, W.; KRIFKA, S. 2-Hydroxyethyl methacrylate-induced apoptosis through the ATM and p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway. **Biomaterials**, v. 35, p. 2890-2904, 2014.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SKRZYPSKI, M.; JASSEM, E.; TARON, M.; SANCHEZ, J.J.; MENDEZ, P.; RZYMAN, WITOLD; G., GRAZYNA; RAZ, D.; JABLONS, D.; PROVENCIOS, M.; MASSUTI, B.; CHAIB, I.; PEREZ-ROCA, L.; JASSEM, J.; ROSELL, R. Three-Gene Expression Signature Predicts Survival in Early-Stage Squamous Cell Carcinoma of the Lung. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 4794-4799, 2008.

SLEZAK, B.; SANTARPIA, P.X.U.T.; MONSUL-BARNES, V.; HEU, R.T.; STRANICK, M.; SULLIVAN, R.; PETROU, I.; BAGLEY, D.; Li, Y. Safety profile of a new liquid whitening gel. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 23(11-1): p. 4–11, 2002.

SOARES, D.G.; RIBEIRO, A.P.D.; VARGAS, F.S.; HEBLING, J.; COSTA, C.A.S. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, p. 1901–1909, 2013.

SOARES, D.G.; PASTANA, J.V.; DUQUE, C.C.; RIBEIRO, A.P.; BASSO, F.G.; HEBLING, J.; COSTA, C.A.S. Influence of Adhesive Restorations on Diffusion of H₂O₂ Released from a Bleaching Agent and Its Toxic Effects on Pulp Cells. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 16(2), p. 123-128, 2014.

SOLOVYAN, V.T. Characterization of apoptotic pathway associated with caspase-independent excision of DNA loop domains. **Experimental Cell Research**, v. 313(7) p.1347-60, 2007.

SOLOVYAN, V.T.; BEZVENYUK, Z.A.; SALMINEN, A.; AUSTIN, C.A.; COURTNEY, M.J. The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 21458–21467, 2002.

SPAGNUOLO, G.; MAURO, C.; LEONARDI, A.; SANTILLO, M.; PATERNÒ, R.; SCHWEIKL, H.; AVVEDIMENTO, E.V.; RENGO, S. NF- κ B Protection against Apoptosis Induced by HEMA. **Journal of Dental Research**, v. 83, p. 837-842, 2004a.

SPAGNUOLO, G.; GALLER, K.; SCHMALZ, G.; COSENTINO, C.; RENGO, S.; SCHWEIKL, H. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Amplifies TEGDMA-induced Apoptosis in Primary Human Pulp Cells. **Journal of Dental Research**, v. 83(9), p. 703-707, 2004b.

SPAGNUOLO, G.; D'ANTÒ, V.; COSENTINO, C.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H.; RENGO, S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. **Biomaterials**, v. 27, p. 1803-1809, 2006.

SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-7, 2011.

SZCZEPANSKA, J.; POPLAWSKI, T.; SYNOWIEC, E.; PAWLOWSKA, E.; CHOJNACKI, C.J.; CHOJNACKI, J.; BLASIAK, J. 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 1561–1574, 2012.

TANAKA, J.; HASHIMOTO, T.; STANSBURY, J.W.; ANTONUCCI, J.M.; SUZUKI, K. Polymer properties on resins composed of UDMA and methacrylates with the carboxyl group. **Dental Materials Journal**, v. 20, p. 206–215, 2001.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews - Molecular cell biology**, v. 9, p. 231-241, 2008.

TIAN, M.; SHINKURA, R.; SHINKURA, N.; ALT, F.W. Growth Retardation, Early Death, and DNA Repair Defects in Mice Deficient for the Nucleotide Excision Repair Enzyme XPF. **Molecular And Cellular Biology**, v. 23(4), p. 1200–1205, 2004.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

URCAN, E.; SCHERTHAN, H.; STYLLOU, M.; HAERTEL, U.; HICKEL, R.; REICHL, F.X. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. **Biomaterials**, v. 31, p. 2010–2014, 2010.

VAN LANDUYT, K.L.; SNAUWAERT, J.; MUNCK, J.D.; PEUMANS, M.; YOSHIDA, Y.; POITEVIN, A.; COUTINHO, E.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; MEERBEEK, B.V. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Biomaterials**, v. 28, p. 3757–3785, 2007.

VANDER, H.M.G.V.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 209-216, 1999.

- VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, v. 44, p. 619–626, 2008.
- VITRAL, J.C.A.; SILVA, A.A.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P.; VITRAL, R.W.F. Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 8(3), p. 359-365, 2008.
- VOLK, J.; ENGELMANN, J.; LEYHAUSEN, G.; GEURTSSEN, W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. **Dental Materials**, v. 22, p. 499–505, 2006.
- VOUSDEN, K.H. p53: death star. **Cell**, v. 103(5), p. 691-964, 2000.
- WANG, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 430-440, 2002.
- WANG, Z-B.; LIU, Y-Q.; CUI, Y-F. Pathways to caspase activation. **Cell Biology International**, v. 29, p. 489-496, 2005.
- WATTANAPAYUNGKUL, P.; MATIS, B.A.; COCHRAN, M.A.; MOORE B.K. A clinical study of the effect of pellicle on the degradation of 10% carbamide peroxide within the first hour. **Quintessence International**, v. 30, p. 737–741, 1999.
- WEI, B.J.; ZHOU, Z.T. Hydrogen peroxide induced apoptosis in SV-40 transformed human salivary gland acinar cells. **Oral Oncology**, v. 43, p. 248–51, 2007.
- WHITE, D.J.; KOZAK, K.M.; ZOLADZ, J.R.; DUSCHNER, H.; GOTZ, H. Peroxide interactions with hard tissues: effects on surface hardness and surface/subsurface ultrastructural properties. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 23, p. 42–48, 2002.
- WISNIEWSKA-JAROSINSKA, M.; POPLAWSKI, T.; CHOJNACKI, C.J.; PAWLOWSKA, E.; KRUPA, R.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 4603–4611, 2011.
- WU, T-T.; LI, L-F.; DU, R.; JIANG, L.; ZHU, Y.Q. Hydrogen Peroxide Induces Apoptosis in Human Dental Pulp Cells via Caspase-9 Dependent Pathway. **Journal of Endodontics**, v. 39(9), p. 1151-1155, 2013.
- YEH, H-W.; CHANG, M-C.; LIN, C-P.; TSENG, W-Y.; CHANG, H-H.; WANG, T-M.; CHEN, Y-J.; LIN, C-C.; LIN, L-D.; JENG, J-H.; YANG, T-T. Comparative cytotoxicity of five current dentin bonding agents: Role of cell cycle deregulation. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 3404-3410, 2009.
- YOSHIDA, K.; KUROGI, T.; TORISU, T.; WATANABE, I.; MURATA, H. Effects of 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate on properties of autopolymerized hard direct denture relined resins. **Dental Materials Journal**, v. 32(5), p. 744–752, 2013.
- ZHAO, W.L.; DANESHPOUY, M.E.; MOUNIER, N.; BRIÈRE, J.; LEBOEUF, C.; PLASSA, L.F.; TURPIN, E.; CAYUELA, J.M.; AMEISEN, J.C.; GISSELBRECHT, C.;

JANIN, A. Prognostic significance of *Bcl-x_L* gene expression and apoptotic cell counts in follicular lymphoma. **Blood Journal**, v. 103, p. 695-697, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

JOURNAL OF DENTISTRY**GUIDE FOR AUTHORS*****Essential title page information***

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

The **title page** should contain the following information:

- Title of paper
- Short title
- Name(s), job titles and address(es) of author(s) (no academic degrees necessary)
- Name, address, telephone, fax and e-mail of the corresponding author
- Up to 6 keywords

Spelling: International English.

Authors are urged to write as concisely as possible.

The house style of Journal of Dentistry requires that articles should be arranged in the following order: Title, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Tables, Figures. A **cover letter** should accompany the new manuscript submission, within which the authors should indicate the significance of the work being submitted in a statement no more than 100 words. A signed **permission note** (details below) must also be included.

Abstract: should not exceed 250 words and should be presented under the following subheadings: Objectives, Methods; Results; Conclusions (For Reviews: Objectives; Data; Sources; Study selection; Conclusions). A 50 word 'Clinical Significance' statement should appear at the end of the abstract advising readers of the clinical importance and relevance of their work. These subheadings should appear in the text of the abstract. Please repeat the title of the article at the top of the abstract page.

Introduction: must be presented in a structured format, covering the following subjects, although not under subheadings: succinct statements of the issue in question, and the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue. In keeping with the house style of Journal of Dentistry, the final paragraph of the introduction should clearly state the aims and/or objective of the work being reported. Prospective authors may find the following form of words to be helpful: "The aim of this paper is to ..." Where appropriate, a hypothesis (e.g. null or a priori) should then be stated.

Keywords: up to 6 keywords should be supplied.

Abbreviations and acronyms: terms and names to be referred to in the form of abbreviations or acronyms must be given in full when first mentioned.

Units: SI units should be used throughout. If non-SI units must be quoted, the SI equivalent must immediately follow in parentheses. The complete names of individual teeth must be given in the text. In tables and legends for illustrations individual teeth should be identified using the FDI two-digit system.

Statistics

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical method(s) used should be specified with references to standard works when possible (with pages specified). See http://www.icmje.org/manuscript_1prepare.html for more detailed guidelines.

References: These should appear in the text in numerical order and should follow a modified form of the Vancouver Reference system (details may be found at <http://www.icmje.org/index.html#reference>). Please note that the house style of the Journal of Dentistry is different from the standard Vancouver reference style in that it includes a requirement:

- to refer to the name of the Journal in full
- to put the name of the Journal in Italics
- to put the volume number in bold

Illustrations: should be submitted electronically using appropriate commercial software. Prospective authors should follow the relevant guidelines (available from: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>). In addition, it is noted that while authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, journals published by Elsevier apply the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

ANEXO B

**UNIVERSITY OF NORTHERN PARANA**

R Marselha, 183 - Jardim Piza – Londrina – PR – 86041100- BRAZIL

Phone: 55 43 3371 7820 Fax: 55 43 3324 9972

August, 2014.

Editor-in-Chief: **Christopher D. Lynch**
Journal of Dentistry

Dear Prof. **Christopher D. Lynch**,

We are sending the paper entitled: "**Cytotoxicity, genotoxicity and modulation of gene expression induced by hydrogen peroxide in cells from the ovary of the Chinese hamster (CHO-K1)**" to be evaluated for publication on the *Journal of Dentistry*. In the present study we found that H₂O₂ can develop toxicity and alter gene expression, particularly those genes related to apoptosis/necrosis and the repair of DNA damage in the CHO-K1 cells. Despite the cytotoxic and genotoxic effects of hydrogen peroxide, the ability of this compound to induce necrosis in higher concentrations suggests low carcinogenic potency and should be safe for clinical application. We thank in advance for any consideration you could do to improve this work.

The contents of this manuscript were not previously presented nor submitted anywhere else.

Best wishes,

Regina Célia Poli-Frederico

Responsible author

Prof. Dr. Regina Célia Poli-Frederico (PhD)

School of Dentistry, University of Northern Parana (UNOPAR)

R Marselha, 183 - Jardim Piza - Londrina,

Paraná – BRAZIL / 86041-100

e-mail: reginafrederico@yahoo.com.br; regina.frederico@unopar.br

Anexo C

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Dentistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Cytotoxicity, genotoxicity and modulation of gene expression induced by hydrogen peroxide in cells from the ovary of the Chinese hamster (CHO-K1)

Article Type: Full Length Article

Keywords: H2O2; MTT; comet assay; apoptosis; necrosis; RT-Qpcr

Corresponding Author: Prof. Regina Célia Poli-Frederico, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: UNOPAR

First Author: Valeria A Bello, Master

Order of Authors: Valeria A Bello, Master; Heloisa L Cilião, Master; Marcelo T Oliveira, Ph.D; Ilce M Cólus, Ph.D; Regina Célia Poli-Frederico, Ph.D.

Abstract: Objectives: The objective of this study was to evaluate the deleterious effects of H2O2 on the cells of the ovary of the Chinese hamster (CHO-K1) and the involvement of this dental material in modulating the expression of genes involved in different biological processes. Methods: The CHO-K1 cells were cultivated in Ham-F10 + DMEM. The cytotoxicity and genotoxicity of hydrogen peroxide were evaluated using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and the Single Cell Gel Electrophoresis (comet assay) test, respectively. Evaluation of the modulation of gene expression was obtained from quantitative PCR, in real time. The results were analyzed using the Kruskal-Wallis/Dunn and ANOVA/Tukey statistical tests. The value used for the level of significance was 5%. Results: Our results showed that a concentration of 3.5 mM was cytotoxic and genotoxic for the CHO-K1 cells and promoted a significant increase in apoptotic and necrotic cells. Alterations in the gene expressions indicated that, for high concentrations, H2O2 seems to lead to a gradual increase in necrotic cells at the expense of apoptotic cells, found in both the apoptosis/necrosis test and the gene expression assays, since pre-apoptotic and anti-apoptotic cells were stimulated in equal measure. Conclusions: We reached the conclusion that H2O2 can develop toxicity and alter gene expression, particularly those genes related to apoptosis/necrosis and the repair of DNA damage in the CHO-K1 cells.

ANEXO D

Author Guidelines: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* Information for Contributors

Aims and Scope

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials is an official journal of the Society for Biomaterials, the Japanese Society for Biomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the Korean Society for Biomaterials. It is a peer-reviewed journal serving the needs of biomaterials professionals who devise, promote, apply, regulate, produce, and market new biomaterials and medical devices. Papers are published on device development, implant retrieval and analysis, manufacturing, regulation of devices, liability and legal issues, standards, reviews of different device areas, and clinical applications. Published manuscripts fit into one of six categories: original research reports, clinical device-related articles, short research and development reports, review, special report, or columns and editorials. Manuscripts from all countries are invited but must be in English. Authors are not required to be members of a Society for Biomaterials.

Types of Articles Considered for Publication

Original Research Reports: Full-length papers consisting of complete and detailed descriptions of a research problem, the experimental approach, the findings, and appropriate discussion. Findings should represent significant new additions to knowledge.

Clinical Device-Related Articles: Full-length papers addressing such issues as material processing, device construction, regulatory matters, clinical trials, and device retrieval.

Reviews: Scholarly and critical topic-oriented reviews that present a state-of-the-art view. While most reviews are solicited, persons interested in contributing may contact the Editor.

Special Reports: Reports of special topic-oriented symposia, device retrieval protocols, or other special reports not described in the above categories, yet of interest to the applied biomaterials research and development community. Potential contributors should contact the Editor before submitting special reports.

Columns and Editorials: While columns and guest editorials are preponderantly solicited, persons interested in becoming columnists or contributing editorials are encouraged to contact the Editor.

Submission of Manuscripts

Online Submission:

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>.

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>. Check for an existing user account. If you are submitting for the first time, and you do not find an existing account, create a new account. Follow all instructions. At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support using the Get Help Now link in the right corner of any screen.

Upon Acceptance: Manuscript files will now automatically be sent to the publisher for production. It is imperative that files be in the correct format to avoid a delay in the production schedule.

JBMR Part B has adopted a policy that requires authors to make a statement concerning potential conflict of interest relating to their submitted articles. The Editorial Board asks authors of original reports and reviews to disclose, at

the time of submission: (1) any financial or employment arrangements they may have with a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or with a company making a competitive product; and (2) any grants or contracts from a government agency, a non profit foundation, or a company supporting the preparation of the manuscript or the described research. This information will be available to the reviewers of the manuscript. If the article is accepted for publication, the editor will discuss with the authors the manner in which such information may be communicated to the reader.

At the time of submission, *JBMR Part B* asks authors to certify that all animals utilized in their research were cared for according to the policies and principles established by the Animal Welfare Act and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Review Process: All original reports and reviews receive critical review by at least two reviewers with expertise in the major subject area of the paper. Reviewers may recommend "Acceptance as is," "Acceptance with modification," or "Rejection." If modification is required, the manuscript is returned to the author(s). The revised manuscript is then re-reviewed by the original reviewers, and even re-revised if necessary. Differences in opinion are resolved by submission either to a third reviewer or the Editor.

Copyright/Licensing

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement: If the On line Open option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing On line Open: If the On line Open option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial –No Derivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

If you select the On line Open option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license: Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Organization and File Formats

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files should be formatted as .doc or .rtf files. The results and discussion sections must be written separately and cannot be combined. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to the Journal design specifications. Do not use desktop publishing software such as PageMaker or Quark Xpress or other software such as Latex. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs "fast save" feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor's automated features to create footnotes or reference lists. Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files; the system will automatically create a pdf file of your paper for these viewers.

Original research and short reports should appear in the following order: title page (including authors and affiliations), abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends. Number pages consecutively starting with the title page as page 1. Abbreviations must conform to those listed in Council of Biology Editors' CBE Style Manual, 5th Edition.

When mentioning a material, chemical reagent, instrument, or other product, use the generic name only. If further identification (proprietary name, manufacturer's name and address) is absolutely required, list it in parentheses.

Title Page: List the full title of the paper and each author's full name (first name, middle initial(s), surname), department, institution, city, and state (and country if other than the United States). Indicate the name and address of the author to whom reprint requests should be sent.

Abstract and Keywords: Include an abstract of about 200 words maximum summarizing the aims, findings, and conclusions of the paper. Below the abstract, list five keywords or phrases that best characterize the subject matter of the manuscript.

Running Heads: Supply a short title of no more than 65 characters, including spaces and punctuations, to be used for running head copy.

References: Number references consecutively as they appear in the text. Material accepted for publication but not yet published may be listed in the References, but unpublished observations, personal communications, and material submitted for publication but not yet accepted should be cited parenthetically within the text (and not included among the numbered references). Style references entries using the Council of Biology Editors Style Manual, 5th Edition formats:

For journal articles:

Alexander A, Green WS. Total hip replacements: A second look. *JSocBiomater* 1989;45:345–366.

For books/chapters:

Ricci JL, Guichet J-M. Total hip replacement: A third look. CindraAB, Franklin DE, editors. *State of the art orthopaedics*, vol 3, Hips. New York: Wiley; 1988:56–59.

For abstracts:

Davidson GRH. Total hip replacement: A fifth look. *TransABCS* 1987;22:341–345.

For presentations:

Goodenough T. Total hip replacement: A sixth look. Presented at the 3rd Annu Mtg Orthop Res Soc, Boston, December 5–7, 1989.

Figure Legends: Please supply complete captions for all figures. Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers and titles for all. All table columns should have an explanatory heading. Tables should be submitted as doc or rtf files (it is preferred that tables are prepared using Word's table edit tool.)

Illustrations: When preparing digital art, please consider:

Resolution:

The minimum requirements for resolution are:

1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.

300 DPI/PPI for picture-only photographs

600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG files are acceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will be required. For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon revision, CMYK color will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

Note that these file formats are not acceptable for printing: JPG, GIF, PNG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphics in Photoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into your page applications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures as JPEG and convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figure files, authors are encouraged to visit <http://cjs.cadmus.com/da/applications.asp>.

To ensure that your digital graphics are suitable for print purposes, please go to Rapid Inspector™ at <http://rapidinspector.cadmus.com/zwi/index.jsp>. This free, stand-alone software application will help you to inspect and verify illustrations right on your computer.

A legend must be provided for each illustration and must define all abbreviations used therein. Legends should be placed at the end of the manuscript text file.

Color Illustrations: Color figures are generally printed in the Journal at the author's expense. The publisher will provide cost estimates prior to printing. A limited number of color figures that are of critical importance and that significantly enhance the presentation will be considered for publication at the publisher's expense subject to editorial recommendation. Final decision on publication of color figures will be at the discretion of the Editor. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. For reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.