Citotoxicidade de diferentes resinas compostas: um estudo “*in vitro*” em cultura de Macrófagos Murine

Cytotoxicity of Different Composite Resins: an *in Vitro* Study in Murine Macrophage Culture

ARMILIANA SOARES NASCIMENTO^I

ELIANE ALVES LIMA^I

YASMINE DE CARVALHO SOUSA^I

JACIANA COSTA AGUIAR^{II}

TERESINA GONÇALVES SILVA^{II}

RODIVAN BRAZ^I

^IUniversidade de Pernambuco (UPE), Camaragibe/PE – Brasil.

^{II}Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE – Brasil.

RESUMO

Introdução: Estudos de citotoxicidade são necessários, uma vez que, quando os compósitos resinosos são expostos ao meio bucal, sofrem degradação e os produtos resultantes podem causar lesão celular.

Objetivo: avaliar “*in vitro*” o efeito citotóxico de extratos de compósitos, recém desenvolvidos, em cultura de células Raw, considerando diferentes períodos de exposição.

Materiais e Métodos: para cada material foram confeccionados corpos de prova e imersos em meio de cultura (DMEN) para obter os extratos em 24, 48 e 72h. Os extratos obtidos foram aplicados sobre a cultura de macrófagos, por 24h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados foram analisados pelos testes de Friedman e Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$).

Resultados: As resinas auras DC4 e Bulk Fill reduziram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle negativo, independentemente do tempo de exposição. A viabilidade celular exposta ao extrato de 72h, para todas as resinas, exceto a Z350, foi menor que nos demais tempos avaliados.

Conclusão: todas as resinas apresentaram potencial citotóxico, contudo mais estudos “*in vitro*” e de acompanhamento clínico se fazem necessários.

Palavras chaves: Compósitos. Citotoxicidade. Macrófagos. *In vitro*.

ABSTRACT

Introduction: Cytotoxicity studies are necessary because composite resins are degraded when exposed to the buccal environment and the degradation products cause cellular lesion.

Aims: *In vitro* evaluation of the direct cytotoxic effect of recently developed composite extracts in Raw cells culture in different exposure times.

Material and Methods: disks of different thicknesses were prepared for each material and immersed in culture medium (DMEN) to obtain the extracts in 24, 48 e 72h. The obtained extracts were applied on the culture of macrophages, for 24h and Cell viability was assessed via MTT assay. Data were analyzed with Friedman and Kruskal Wallis tests ($\alpha=0.05$).

Results: Aura resins (DC4 and Bulk fill) significantly reduced cell viability compared to negative control, regardless of exposure time. Cell viability exposed to the 72h extract for all resins, except Z350, was lower than in the other evaluated times. **Conclusion:** all studied resins are potentially cytotoxic; however, more *in vitro* studies and clinical follow-up are necessary.

Key-words: Composite. Cytotoxicity. Macrophage. *In vitro*.

INTRODUÇÃO

Os compósitos odontológicos representam, atualmente, um dos materiais mais utilizados em procedimentos restauradores, especialmente pelas suas propriedades estéticas e custo-benefício. No entanto, preocupações significativas permanecem em relação à contração de polimerização, ao grau de conversão e à sua biocompatibilidade/citotoxicidade.¹ A citotoxicidade desses materiais é atribuída à quantidade de monômeros residuais liberados, resultante de uma incompleta polimerização ou à degradação da matriz orgânica em contato com a saliva,² ou ainda, pode-se dizer que é dependente da composição, da quantidade e do tipo de “componentes lixiviados e liberados” (monômeros livres não polimerizados) durante a degradação ou da erosão inerente ao ambiente bucal.³

A liberação de monômeros, especialmente à base de metacrilato (Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA), co-monômeros (TEGDMA e HEMA) e de alguns aditivos dos compósitos apresentam efeitos adversos locais (alterações pulpares, gengivite marginal e reações alérgicas) e até mesmo sistêmicos, com potencial alérgico,⁴ citotóxico,⁵ genotóxico⁶ e tóxicos para o sistema reprodutivo.⁷ O mecanismo exato pelo qual isso ocorre ainda não foi estabelecido na literatura, porém acredita-se que a redução do nível celular de glutatona⁸ e o aumento do nível de espécies reativas de oxigênio são os principais responsáveis para o desencadeamento desse processo,⁹ sendo o último associado aos danos que ocorrem no DNA da célula, exposta ao metacrilato.¹⁰

Sendo assim, resinas compostas com modificações na formulação química e nas propriedades de cura têm sido desenvolvidas, com a proposta de minimizar ou eliminar esses inconvenientes. Contudo, pouco se sabe sobre esses materiais e devido às dificuldades de realização de estudos “in vivo”, este estudo investigou “in vitro” o efeito citotóxico de extratos de compósitos, recém desenvolvidos, em

macrófagos, considerando diferentes períodos de exposição. As hipóteses testadas foram de que o extrato de nenhum dos compósitos testados apresentaria potencial citotóxico para as células e que o tempo de exposição aos extratos não influenciaria a viabilidade celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Confecção dos corpos de prova e Preparo dos extratos

Os materiais selecionados para este estudo incluíram duas resinas restauradoras (Filtek Z350 XT-3M/ESPE, St Paul, MN, USA e Aura DC4 – SDI, São Paulo, Brasil), uma resina para base (Beautifil Flow Plus – Shofu Inc – Kyoto, Japan) e uma resina bulk fill restauradora (Aura Bulk Fill – SDI, São Paulo, Brasil) todas com indicação para restaurações diretas em dentes posteriores. Seus componentes, instruções de uso, lote e fabricante estão listados no Quadro 1. Todos os materiais foram preparados e manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes, em condições de assepsia (fluxo laminar), para limitar qualquer risco de contaminação biológica das células e do meio de cultura. Discos de cada material, com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (n=3), foram confeccionados sobre uma placa de vidro, cobertos com uma tira de poliéster para minimizar a ação do oxigênio e melhorar a lisura superficial. Todas as amostras foram fotopolimerizadas por 20 seg, com um dispositivo de LED (KaVo Poly Wireless, KaVo – Brasil), calibrado com potência luminosa em 1200 mW/cm².

Antes de iniciar o teste, as amostras foram expostas à luz ultravioleta por 45 minutos. Os extratos foram preparados pela imersão das amostras em 1ml de meio DMEM (ISO 10993-5).¹¹ O extrato obtido de cada amostra foi filtrado com filtro 0.22µm (Millex, Darmstadt, Alemanha) após os períodos de imersão (24, 48 e 72 horas), a fim de eliminar micro-organismos e partículas sólidas. O extrato original (1:1) foi coletado e diluído para obter concentrações de 1:10.

Quadro 1: Materiais, lote, composição e protocolo de uso, de acordo com o fabricante.

Resinas e Lote	Composição	Espessura da amostra (mm)	Tempo de fotopolimerização e intensidade da luz
Filtek Z350 XT universal restorative (3M ESPE, St Paul, MN, EUA) – 236236.	Matriz orgânica: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, PEGDMA, Bis-EMA. Partículas de carga: sílica, aglomerado de zircônia/sílica. Carga: 72,5% (peso) e 55,6% (volume).	2	20s $\geq$ 400 mW/cm ² (luz LED ou halógena).
Beautifil Flow Plus (Shofu Inc – Kyoto, Japan) – #093014.	Matriz orgânica: Bis-GMA (15%), TEGDMA (13%). Partículas de carga: partículas de vidro Multifuncional, partículas de S-PRG e aglomerado de fluoroboroaluminosilicate. Carga: 67,3% (peso) e 47,0% (volume).	2	10s $\geq$ 1000 mW/cm ² (luz LED ou halógena).
Aura DC4 (SDI) São Paulo, Brasil – 140631.	Não informado pelo fabricante.	2	20s $\geq$ 1000 mW/cm ² (luz LED ou halógena).
Aura Bulk Fill (SDI) São Paulo, Brasil – 140589.	Uma nova composição de resina de baixa concentração com uma carga de Ultra Alta Densidade (UAD).	4	20s $\geq$ 1000 mW/cm ² (LED) ou 2x20s (luz halógena).

CULTURA E TESTE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

A linhagem celular imortalizada RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foi cultivada em meio de cultura Dulbecco Medium Eagle Modified (DMEM) (Invitrogen), suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen) e 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomicina, Invitrogen), incubados a 37°C e

5% de CO₂. Antes do experimento a densidade celular foi avaliada e as células foram separadas com 2ml/5min de solução de tripsina (0,25%) - Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), neutralizadas com uma mesma quantidade de meio de cultura e a viabilidade celular (98%) obtida. Subsequentemente as células foram semeadas em placas de 96 poços (TPP, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 1×10^5 céls/ml por poço, contendo 100µl de meio cada, por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Após

esse período, o meio foi removido e substituído pelos extratos das resinas. O controle negativo considerou apenas as células tratadas com o meio de cultura. O metabolismo celular foi avaliado pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), de acordo com a norma BS EN ISO 10993-5: 2009 (*Part 5: Test for in vitro cytotoxicity*)¹¹ e a absorvância foi medida a 570 nm e 650 nm usando um espectrofotômetro. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada considerando o controle negativo em 100%.

ANÁLISE DOS DADOS

As médias de cada grupo obtidas a partir do ensaio de MTT foram calculadas e transformadas em porcentagem, o que representou o efeito inibitório da atividade mitocondrial de células pelos extratos. O

controle negativo (meio de cultura) foi definido como tendo o metabolismo celular de 100%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 21, com aplicação dos testes Kruskal-Wallis e Friedman. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Extratos de todos os compósitos reduziram a viabilidade celular (Tabela 1 e Figura 1). Para os períodos de armazenamento de 24h e 48h, houve uma diminuição na porcentagem de células viáveis para todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle. Após 72h de armazenamento, o efeito citotóxico das resinas aumentou significativamente em relação ao grupo controle, com exceção da resina Z350, que não mostrou resultados estatisticamente significantes quando se considerou o tempo de exposição.

Tabela 1 – Estatísticas da toxicidade segundo o grupo e tempo de avaliação(*):

Diferença significativa ao nível de 5,0%. (1): Através do teste de Friedman com comparações do referido teste. (2):

Grupo	Tempo de avaliação			Valor de p
	24h Média ± DP (CV%)	48h Média ± DP (CV%)	72h Média ± DP (CV%)	
AURA DC	0,42 ± 0,16 (30,10) (A, a)	0,76 ± 0,14 (18,42) (A, b)	0,14 ± 0,04 (28,57) (A, b)	p ⁽¹⁾ = 0,018*
AURA BF	0,50 ± 0,09 (18,00) (A, a)	0,89 ± 0,07 (7,87) (A, b)	0,66 ± 0,05 (7,58) (B, b)	p ⁽¹⁾ = 0,018*
BEAUTIFIL FLOW	0,09 ± 0,02 (22,22) (B, a)	0,10 ± 0,02 (20,00) (B, a)	0,21 ± 0,05 (23,81) (C, b)	p ⁽¹⁾ = 0,001*
Z350	0,49 ± 0,15 (30,61) (A)	0,74 ± 0,19 (25,68) (A)	0,62 ± 0,03 (4,84) (B)	p ⁽¹⁾ = 0,083
Controle	0,39 ± 0,12 (30,77) (A, a)	0,80 ± 0,08 (10,00) (A, b)	0,49 ± 0,06 (12,24) (D, b)	p ⁽¹⁾ < 0,001*
Valor de p	p ⁽²⁾ = 0,016*	p ⁽²⁾ = 0,016*	p ⁽²⁾ < 0,001*	

Através do teste Kruskal Wallis com comparações múltiplas do referido teste. Obs.: Se todas as letras minúsculas entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as avaliações. Se todas as letras maiúsculas entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes.

Figura 1. Viabilidade celular (%) dos macrófagos (células Raw) após exposição aos extratos dos compósitos, determinados pelo ensaio de MTT. (1) – Indica diferenças estatisticamente significantes da viabilidade celular em relação ao tempo de exposição; (2) – Indica a redução da viabilidade celular significativa das resinas comparado com o grupo controle.

DISCUSSÃO

A citotoxicidade de resinas compostas de três marcas comerciais foi avaliada, considerando dois fatores: tipo de resina e tempo de exposição das células aos extratos. Os resultados deste estudo levaram à rejeição total da primeira hipótese nula. Os resultados mostraram potencial citotóxico para todos os compósitos experimentais, em relação ao grupo controle negativo, estando em acordo com outros estudos "*in vitro*".^{12,2,13} A citotoxicidade das resinas compostas tem sido associada à quantidade e ao tipo de monômero residual liberado, demonstrando haver uma correlação entre esse fenômeno e a perda de massa e/ou baixo grau de conversão.² Apesar de serem consideradas bem toleradas biologicamente, a literatura relata indícios de efeitos alérgicos aos tecidos da mucosa oral¹⁴ devido à dissolução do metacrilato e a lixiviação dos seus componentes.³ A resina Z350 foi a que menos diminuiu a viabilidade celular (23%)

entre as resinas testadas. Diferente do estudo de Toh et al.¹⁵ (2015) onde a viabilidade celular para a mesma resina, com 2 mm de espessura, foi reduzida para 66%. Nesse mesmo estudo, quando utilizado amostras com 4 mm de espessura a viabilidade caiu significativamente para 36%, o que demonstra menor grau de conversão, por conseguinte maior número de monômeros livres.

É sabido que a intensidade e a potência da luz influenciam na polimerização dos compósitos, e quando é aplicada de forma inadequada, resulta na redução do grau de conversão e permanência de monômeros sem estabelecer ligações de carbono, que além de causar efeitos negativos às propriedades físicas e mecânicas dos materiais, também aumenta a citotoxicidade dos mesmos.^{16,17,2} Neste estudo não foi investigado o tipo e a quantidade de monômeros residuais liberados e presentes nos extratos dos compósitos, porém acredita-se haver uma maior concentração dos monômeros hidrofílicos, pela afinidade com o

meio de cultura. Tem sido demonstrado que, mesmo em baixas concentrações o HEMA pode alterar significativamente a morfologia de fibroblastos gengivais humano¹⁸ e células primárias da polpa.¹⁹ Em acordo com resultados deste estudo Becher *et al.*²⁰ (2006) relatam diminuição da viabilidade celular em cultura de macrófagos, após exposição a monômeros como o TEGMA, HEMA e GDMA. Entre eles o Bis-GMA é o monômero considerado mais citotóxico²¹ mesmo em pequenas concentrações, apesar de ser hidrofóbico e de possuir alto peso molecular, o que limitaria sua difusão em meio aquoso.²²

Tanto o HEMA como o TEGDMA são capazes de induzir morte celular por apoptose como por necrose, na proporção concentração-dependente.³ Isso pode explicar em parte os resultados obtidos, especialmente para as resinas AURA BF e AURA DC4, embora não se tenha informações sobre seus componentes. A Aura DC4 reduziu a viabilidade celular em 95% e a Aura Bulk Fill em 62%, após 72h. Porém, há necessidade de análise do tipo de morte celular ocorrida, visto que quando a mesma acontece por apoptose, ocorre uma remoção das células mortas por fagocitose, com leve resposta inflamatória, enquanto que num quadro necrótico a resposta inflamatória é mais grave, e geralmente causa injúria aos tecidos circundantes.²³

Outro fator a ser considerado é que um quadro de morte celular por apoptose geralmente está associado à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando efeitos adversos ao DNA da célula.²² Esse processo ocorre após exposição da célula a monômeros capazes de interferir na regularização da produção de citocinas, diminuindo por conseguinte a expressão do antioxidante glutathione. Logo ocorre um aumento dos níveis intracelulares de EROs levando à morte por apoptose. Outro fator que pode levar à morte celular por apoptose é a presença do componente

citocromo C, uma hemoproteína que reside no espaço intermembranoso da mitocôndria que, por sua vez, é convertido em peroxidase por meio da geração de EROs. Assim, o Citocromo C realiza a peroxidação lipídica da fosfatilserina, induzindo à exposição de sinais de reconhecimento dos macrófagos para realizarem a fagocitose.^{24,25}

Cabe ressaltar o efeito negativo da canfarquinona (CQ) e do pH na diminuição da viabilidade celular. A CQ tem sido o fotoiniciador de escolha da maioria dos compósitos resinosos. Por não ser incorporada à cadeia polimérica, após a polimerização ela pode ser completamente lixiviada e causar estresse oxidativo, danos ao DNA e citotoxicidade.²⁶ A nova formulação de resinas (bulk fill) introduzidas no mercado, trazem em suas composições um novo fotoiniciador denominado “ivocerin”, além de moduladores de contração.²⁷ Porém, ainda não existem dados na literatura sobre seus efeitos nas células e na resina bulk fill testada nesse experimento o fabricante não revela sua composição. Já o pH em condições ácidas também pode provocar efeitos adversos às células.

A segunda hipótese, nula, foi parcialmente rejeitada. O efeito citotóxico do extrato da resina Z350 não foi afetado estatisticamente pelo tempo de exposição. Quanto às outras resinas, todas apresentaram redução significativa após 72h de exposição, o que nos faz pressupor que os componentes das resinas são continuamente liberados após a polimerização, corroborando com o estudo de Karaarslan *et al.*²⁸ (2011). Por sua vez, Yildirin-Bicer *et al.*²⁹ (2013) relatam que o tempo de exposição de 24h mostrou ser o período mais citotóxico. Já Tsitrou *et al.*³⁰ (2014) relataram que tanto o tempo, como a solução e o tipo de material usado influenciam significativamente na detecção de monômeros residuais e na citotoxicidade.¹⁶ Nesse estudo, foi utilizado um meio aquoso (DMEM) através da técnica

direta, o que pode ter favorecido a dissolução de monômeros hidrofílicos e de baixo peso molecular.

Embora os achados deste estudo apontem claramente para a citotoxicidade substancial das resinas testadas, é importante reconhecer a natureza limitada do experimento "in vitro". Sugere-se a realização de novas pesquisas *in vitro* que possam avaliar o tipo e a quantidade de monômero liberado, o tipo de morte celular ocorrido e a realização de estudos de acompanhamento clínico a fim de comprovar as implicações clínicas desses achados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todas as resinas apresentaram potencial citotóxico, que foi aumentando com o tempo de exposição das células aos extratos.

Conflito de interesse: Os autores não têm qualquer conflito de interesse seja financeiro, pessoal ou de qualquer natureza, relativo a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Moharamzadeh K., Brook IM, Scutt AM, Thornhill MH, Van Noort R. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. **J Dent** 2008 May; 36 (5): 331-36.
2. Salehi S., Gwinner F., Mitchell JC, Pfeifer C., Ferracane JL. Cytotoxicity of Resin Composites Containing Bioactive Glass Fillers. **Dent Mater**. 2015 Feb.; 31 (2): 195-03.
3. Darmani H., Al-Hiyasat IAS, Milhem MM. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. **Quintessence Int** 2007 Oct.; 38 (9): 789-95.
4. Alanko K., Susitaival P., Jolanki R., Kanerva L. Occupational skin diseases among dental nurses. **Contact Dermat** 2004 Feb.; 50 (2): 77-82.
5. Brackett MG, Bouillaguet S., Lockwood PE, Rotenberg S., Lewis JB, Messer RL, et al. In vitro cytotoxicity of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 2007 May; 81 (2): 397-02.
6. Nomura Y., Teshima W., Kawahara T., Kawahara T., Tanaka N., Ishibashi H., et al. Genotoxicity of dental resin polymerization initiators in vitro. **J Mater Sci Mater Med** 2006 Jan.; 17 (1): 29-32.
7. Darmani H., Al-Hiyasat AS. The effects of BIS-GMA and TEG-DMA on female mouse fertility. **Dent Mater** 2006 Jan.; 22 (4): 353-58.
8. Engelmann J., Leyhausen G., Leibfritz D., Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. **J Biomed Mater Res** 2002; 63 (6): 746-51.
9. Samuelsen JT, Dahl JE, 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. **Dent Mater** 2007 Jan.; 23 (1): 34-9.
10. Schweikl H., Spagnuolo G., Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **J Dent Res** 2006 Jan.; 85 (10): 870-77.
11. International Organization for Standardization (ISO). **Biological evaluation of medical devices**. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009). Retrieved online 02, 2017 from: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36406
12. Ahmed RH, Aref MI, Hassan RM, Mohammed NR. Cytotoxic Effect of Composite Resin and Amalgam Filling Materials on Human Labial and Buccal Epithelium. **Nature Scienc** 2010; 8:48-53.
13. Yalcin M., Ahmetoglu F., Sisman R., Bozkurt BS, Hakki SS. Cytotoxicity of low shrink composites with new monomer technology on bovine dental pulp-derived cells. **Hum Exp Toxicol** 2015 Jan.; 34 (1): 93-9.
14. Sevkusic M., Schuster L., Rothmund L., Dettinger K., Maier M., Hickel R., et al. The elution and breakdown behavior of constituents from various light-cured composites. **Dent Mater** 2014 Jun.; 30 (6): 619-31.
15. Toh WS, YapAUJ, Lim SY. In Vitro Biocompatibility of Contemporary Bulkfill Composites. **Oper Dent** 2015 Nov./Dec.; 40 (6): 644-52.

16. Ak AT, Alpoz AR, Bayraktar O., Ertugrul F. Monomer release from resin based dental materials cured with LED and halogen lights. **Eur J Dent** 2010 Jan.; 4 (1): 34-40.
17. Sigusch BW, Pflaum T., Völpe A., Gretschi K., Hoy S., Watts DC, et al. Resin-composite cytotoxicity varies with shade and irradiance. **Dent Mater** 2012 Mar.; 28 (3): 312-19.
18. Falconi M., Teti G., Zago M., Pelotti S., Breschi L., Mazzotti G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. **Cell Biol Toxicol** 2007 Sep.; 23 (5): 313-22.
19. Spagnuolo G., D'Anto V., Valletta R., Strisciuglio C., Schmalz G., Schweikl H., et al. Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on human pulp cell survival pathways ERK and AKT. **J Endod** 2008 Jun.; 34 (6): 684-88.
20. Becher R., Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E., Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. **Dent Mater** 2006 Jul.; 22 (7): 630-40.
21. Anand VS, Balasubramanian V. Effect of resin chemistry on depth of cure and cytotoxicity of dental resin composites. **Mat Sci Eng** 2014; 181: 33-8.
22. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. **Dent Mater** 2006 Dec.; 22 (12): 1.086-92.
23. Okada H., Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer** 2004 Aug.; 4 (8): 592-603.
24. Krifka S., Seidenader C., Hiller KA, Schmalz G., Schweikl H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. **Clin Oral Investig** 2012 Feb.; 16 (1): 215-24.
25. Krifka S., Spagnuolo G., Schmalz G., Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. **Biomater** 2013 Jun.; 34 (19): 4.555-63.
26. Volk J., Zieman C., Leyhausen G., Geurtsen W. Non-irradiated camphorquinone induces DNA damage in human gingival fibroblasts. **Dent Mater** 2009 Dec.; 25 (12): 1.556-63.
27. Sunbul HA, Silikas N., Watts DC. Surface and bulk properties of dental resin- composites after solvent storage. **Dent Mater** 2016 Aug.; 32 (8): 987-97.
28. Karaarslan ES, Altintas S., Bulbul M, Cebe MA, Usumez A. High performance liquid chromatography analysis of monomers from one composite resin cured with different polymerization methods. **Mat Res Innov** 2011; 15: 124-29.
29. Yildirim-Bicer AZ, Ergun G., Egilmez F., Demirkoprulu H. In vitro cytotoxicity of indirect composite resins: Effect of storing in artificial saliva. **Indian J Dent Res** 2013 Jan./Feb.; 24 (1): 81-6.
30. Tsitrou E., Kelogrigoris S., Koulaouzidou E., Antoniadis-Halvatjoglou M., Koliniotou-Koumpia E., et al. Effect of extraction media and storage time on the elution of monomers from four contemporary resin composite materials. **Toxicol Int** 2014 Jan.; 21 (1): 89-95.

DADOS DOS AUTORES

ARMILIANA SOARES NASCIMENTO

Doutoranda em Odontologia na Universidade de Pernambuco. Mestrado em Odontologia pela Universidade Estadual da Paraíba. Camaragibe/PE - Brasil armiliana@hotmail.com

ELIANE ALVES LIMA

Doutoranda em Odontologia na Universidade de Pernambuco. Mestrado em Odontologia pela Universidade de Pernambuco. Camaragibe/PE - Brasil. eliane_alveslima@hotmail.com

YASMINE DE CARVALHO SOUSA

Doutoranda em Odontologia na Universidade de Pernambuco. Mestrado em Odontologia pela Universidade de Pernambuco. Camaragibe/PE - Brasil. yasmine.carvalho@gmail.com

JACIANA DOS SANTOS AGUIAR

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco. Recife/PE - Brasil. jaciana_aguiar@yahoo.com.br

TERESINA GONÇALVES SILVA

Doutora em co-tutela em Chimie Thérapeutique pela Université de la Méditerranée de Marseille-France. Professora da Universidade Federal de Pernambuco. Recife/PE - Brasil. teresinha100@gmail.com

RODIVAN BRAZ

Doutor em Odontologia pela Universidade de Pernambuco. Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Pernambuco da Universidade de Pernambuco. Camaragibe/PE – Brasil. rodivanbraz@gmail.com

Submetido em: 27-7-2017

Aceito em: 16-11-2017