

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOMODULADOR DO NITRATO DE
CÉRIO INCORPORADO EM RESINAS ACRÍLICAS
TERMOPOLIMERIZÁVEIS SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS

PRISCILLA KELLY BATISTA DA SILVA LEITE



João Pessoa – PB

2017

PRISCILLA KELLY BATISTA DA SILVA LEITE

AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOMODULADOR DO NITRATO DE
CÉRIO INCORPORADO EM RESINAS ACRÍLICAS
TERMOPOLIMERIZÁVEIS SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

João Pessoa – PB

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L533a Leite, Priscilla Kelly Batista da Silva.

Avaliação do perfil imunomodulador do nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis sobre leucócitos humanos / Priscilla Kelly Batista da Silva Leite. - João Pessoa, 2017.

60 f.

Orientação: André Ulisses Dantas Batista.

Coorientação: Lúcio Roberto Cançado Castellano.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.


1. cério. 2. polimetil metacrilato. 3. imunomodulação.
I. Batista, André Ulisses Dantas. II. Título.

UFPB/BC

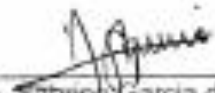
PRISCILLA KELLY BATISTA DA SILVA LEITE

AVALIAÇÃO IMUNOMODULADORA DO NITRATO DO CÉRIO
INCORPORADOS EM RESINAS ACRÍLICAS
TERMOPOLIMERIZÁVEIS SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS


Banca Examinadora



Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista
Orientador



Prof. Dra. Sabrina Garcia de Aquino
Examinador - UFPB



Prof. Dr. Bruno César de Vasconcelos Gurgel
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minhas irmãs, meu sobrinho e minha Tia Toinha.

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre, por sempre permitir que meus sonhos, mesmo que com todas as dificuldades, se tornassem reais;

Aos meus pais, Maurício e Bernadete, por todo amor, carinho, dedicação e incentivo, sem vocês como minha base nada seria possível;

Às minhas queridas irmãs, Danielle e Vanessa, por sempre me apoiarem e serem meu suporte em todos os momentos, especialmente a Danielle, por trazer ao mundo nosso primeiro sobrinho maravilhoso, Pedrinho;

Aos meus avós paternos (in memoriam) que me acolheram como filha em João Pessoa desde cursinho, graduação e pós-graduações, muitas saudades;

À toda minha família pelos momentos de descontração e incentivo, especialmente a minha Tia Toinha pelo amor e carinho incondicional;

Ao meu namorado, Robinho, por tornar minha vida mais leve e feliz, por aguentar todos os meus momentos de desespero quando eu achava que tudo ia dar errado, pela ajuda no inglês e artigo. Pelo amor, carinho e momentos de descontração com seus filhos Tici e Thales;

Às queridas e sólidas amigas que construí no mestrado, Rebeca, Klidenberg e Pedro, obrigada pelo carinho, descontração e cafés; em especial a Rebeca pelas águas deionizadas, pelas ajudas no prisma e pelo seu carinho;

Aos amigos Jefferson e Lanne, por todo suporte laboratorial na realização dos experimentos, em dispor do seu tempo para ajudar na realização da minha pesquisa, sem a ajuda de vocês minha pesquisa não teria sido concluída;

À Luana, pela disponibilidade para coleta de sangue dos voluntários;

Ao professor e orientador André, por acreditar no meu potencial desde a graduação. Obrigada pelos ensinamentos, suporte e apoio por mais uma vitória na minha vida;

Ao professor Lúcio, por disponibilizar seu laboratório e pelo suporte na co-orientação da minha pesquisa;

À professora Sabrina Aquino e Bruno Gurgel por aceitarem compor à banca;

À Rebeca Tibau, técnica no Laboratório de Biomateriais (LABIO), pelo suporte técnico;

Aos funcionários da Escola Técnica em Saúde pelo suporte de infraestrutura;

Aos professores que fazem o PPGO-UFPB pelos ensinamentos no decorrer desses dois anos e aos órgãos de fomento à pesquisa;

Aos queridos Helene, Bruno, Taisa, José Cordeiro, Ohana, Laís e demais companheiros da turma do mestrado pela parceria.

Aos amigos de sempre, Brunno, Jean, Rodolpho e Segundo pelos momentos de descontração e amizade de tantos anos.

EPÍGRAFE

“Tudo que tem realmente algum valor nas nossas vidas requer esforços disciplinados durante um certo período de tempo. Não existem atalhos ou passagens secretas para o sucesso duradouro”.

Jeffrey Keller

RESUMO

Introdução: Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de melhorar, através da incorporação de biomateriais, características mecânicas, físicas, antimicrobianas e da biocompatibilidade das resinas acrílicas de poli (metil metacrilato) (PMMA) utilizadas para base de prótese. O nitrato de cério tem aplicação no tratamento de queimaduras e apresenta efeito antimicrobiano, inclusive contra *C. albicans*. Uma nova estratégia terapêutica para a estomatite protética, baseada na incorporação de um biomaterial é relevante para prática clínica. Neste contexto, a atividade imunomoduladora do nitrato de cério incorporado às resinas ainda não foi investigada. **Objetivo:** avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade e imunomodulação do nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis sobre leucócitos isolados do sangue humano. **Metodologia:** A citotoxicidade foi avaliada utilizando o alamarBlue® sobre PBMC humanos isolados do sangue através do protocolo Ficoll Paque. Os dados foram analisados através do teste de Kruskal Wallis com o *post hoc* de Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados:** A viabilidade do PBMC na presença da solução do nitrato de cério mostrou-se ser dependente da dose (3250 $\mu\text{L/ml}$ - 98,55% e 6500 $\mu\text{L/ml}$ - 16,61%). Na presença dos corpos de prova não foi observado redução a viabilidade celular das PBMC nas concentrações incorporadas estudadas comparadas com o grupo controle. **Conclusão:** A solução isolada do nitrato de cério não apresentou citotoxicidade frente as células PBMC até a concentração 3250 $\mu\text{g/mL}$. Quando incorporada na resina acrílica termopolimerizável, não apresentou citotoxicidade frente as células PBMC isoladas do sangue humano nas duas concentrações estudadas (16xCIM e 32xCIM).

Descritores: cério, polimetil metacrilato, imunomodulação.

ABSTRACT

Introduction: Numerous researches have been developed in order to improve the mechanical, physical, antimicrobial and biocompatibility characteristics of acrylic poly (methyl methacrylate) (PMMA) resins used for prosthesis based on the incorporation of biomaterials. Cerium nitrate has application in the treatment of burns and has an antimicrobial effect, even against *C. albicans*. A new therapeutic strategy for prosthetic stomatitis, based on the incorporation of a biomaterial is relevant for clinical practice. In this context, the immunomodulatory activity of cerium nitrate incorporated into the resins has not been investigated yet. **Aim:** to evaluate, in vitro, the biocompatibility and immunomodulation of cerium nitrate incorporated in thermopolymerizable acrylic resins on leukocytes isolated from human blood. **Method:** Cytotoxicity was assessed using alamarBlue® on human PBMC isolated from the blood through the Ficoll Paque protocol. The data were tabulated through the Kruskal Wallis test with Tukey post hoc. **Results:** The viability of PBMC in the presence of cerium nitrate solution was shown to be dose-dependent (3250 µL / ml - 98.55% and 6500 µL / ml - 16.61%). In the presence of the test specimens, the cellular viability of PBMC was not observed at the incorporated concentrations studied compared to the control group. **Conclusion:** The isolated solution of cerium nitrate did not show cytotoxicity against PBMC cells up to 3250 µg / mL. When incorporated in thermopolymerizable acrylic resin, it did not present cytotoxicity to PBMC isolated from human blood at the two concentrations studied (16xCIM and 32xCIM).

Keywords: cerium, polymethyl methacrylate, immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
Au	Ouro
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CD	Grupamento de diferenciação
Ce	Cério
CeO_2	Óxido de cério
$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de cério hexahidratado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO_2	Gás carbônico
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio Padrão
FBS	Soro Fetal Bovino
g	Gramas
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
L	Litro
LABIMIC	Laboratório de Microbiologia
LABIO	Laboratório Integrado de Biomateriais
LACEC	Laboratório de Análise e Cultivo Celular
μg	Micrograma
μM	Micromolar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mol	Molar
Nm	Nanômetro
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PHA	Fitohemaglutinina
PMMA	Poli (metil metacrilato)
PMN	Células polimorfonucleares do sangue periférico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium (Meio de cultura para células)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. CAPÍTULO 1	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Considerações éticas	22
2.2. Preparo das soluções químicas com nitrato de cério	22
2.3. Confeção dos corpos de prova em resina acrílica de PMMA	23
2.4. Isolamento das PMBCs e PMNs do sangue periférico	23
2.5. Ensaio de citotoxicidade das PBMC	25
2.6. Análise dos dados	26
3. RESULTADOS	26
3.1. Citotoxicidade celular das PBMC frente à solução de nitrato de cério	26
3.2. Citotoxicidade celular das PBMC na presença dos corpos de prova	26
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	29
6. APÊNDICES	32
7. REFERÊNCIAS	32
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	40
4. CONCLUSÃO	42
5. REFERÊNCIAS*	43
6. ANEXO	46
7. APÊNDICE	42

1. INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma desordem muito comum que afeta portadores de prótese bucal, caracterizando-se como um processo inflamatório nas áreas mucosas que são cobertas pela prótese apresentando, geralmente, eritemas (1,2). Essa condição inflamatória é uma das mais frequentes que acometem a cavidade oral, pois com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento da população, a prevalência de edentulismo parcial e total aumenta, e, conseqüentemente, existirá um maior número de usuários de próteses dentárias (3–7).

Nos usuários de próteses, a EP é uma das doenças mais comumente encontradas, afetando entre 15 a 70% dos indivíduos acima de 65 anos, especialmente aqueles usuários de próteses totais (1,2,8,9). Embora seja reconhecidamente de etiologia multifatorial, envolvendo fatores locais e sistêmicos, a etiologia da EP é fortemente associada à presença de fungos do gênero *Candida* spp., presentes na superfície da prótese e/ou mucosa. (6,10). Os fungos do gênero *Candida* spp, especialmente *Candida albicans*. são comensais frequentemente encontrados na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, usuários ou não de próteses dentárias removíveis. Entretanto, podem alterar sua relação de comensais para patogênicos, alterando sua morfologia de levedura para hifa, além da expressão de diversos fatores de virulência, como a secreção de enzimas como proteases e fosfolipases, o que amplia sua capacidade de adesão e penetração no tecido.(2,6)

Os fatores que podem mediar essa alteração de virulência podem estar relacionados a fatores sistêmicos do hospedeiro, tais como resposta imune deprimida. Idade, deficiências vitamínicas, diabetes, uso de medicação imunossupressora, xerostomia, fumo e uso prolongado de antibióticos, os quais podem favorecer a proliferação dos fungos. Fatores locais importantes são os fatores relacionados com as próteses, como trauma, má higiene, uso noturno ou falta de retenção e estabilidade, além da presença de rugosidades e porosidades na superfície e interior das próteses dentárias à base de resina acrílica. (2,6,9,11).

A resina acrílica de poli (metil metacrilato) (PMMA) é o material de primeira escolha para a confecção das próteses totais, parciais removíveis, próteses totais sobre implantes e diversos tipos de aparelhos ortodônticos removíveis, por ser de fácil manipulação, baixo custo, reproduzir a forma, tamanho e cor dos tecidos bucais, além de ser biocompatível e possuir propriedades químicas e mecânicas adequadas (12,13).

O método de polimerização, a temperatura e o ciclo de polimerização são características decisivas na citotoxicidade das resinas acrílicas. Isto é determinado pela quantidade de monômeros residuais liberados no processo de polimerização tanto de resinas acrílicas autopolimerizáveis quanto nas termopolimerizáveis, onde as primeiras liberam maior quantidade de monômeros residuais que as segundas, sendo assim mais citotóxicas (12). Entretanto, mesmo as resinas acrílicas de PMMA ativadas por calor possuem monômeros residuais capazes de induzir citotoxicidade como foi observado nos estudos de Jorge et al. (14) e Ebrahimi Saravi, Vojdani, Bahrani (15).

Alguns fatores podem interferir na quantidade desses monômeros residuais, tais como: a razão polímero/monômero, ou seja, quanto maior a quantidade de monômero adicionado à mistura, maior a quantidade de monômero residual, por isso deve-se seguir à risca as proporções recomendadas pelo fabricante; e o tempo de armazenamento imerso em água, outra característica que diminui a quantidade de monômero residual (14). Segundo Rashid, Sheikh, Vohra (16) as resinas polimerizadas por calor promovem um nível menor de liberação de monômero residual quando comparadas as resinas autopolimerizáveis. Todos esses fatores justificam a utilização das resinas termopolimerizáveis em microondas neste estudo.

Embora reações alérgicas e irritação mecânica tenham sido propostas como possíveis causas da estomatite protética, a cavidade oral é um ambiente favorável à proliferação de microrganismos já existentes e é frequente a infecção oportunista por *Candida spp.* nesse tipo de lesão oral (8).

A susceptibilidade à colonização microbiana no ambiente oral nas bases de prótese de PMMA é uma constante, pois, a ausência de carga iônica do PMMA impede a adsorção de moléculas salivares de defesa na superfície da prótese, além de falhas que podem ocorrer no processamento laboratorial

ocasionando as porosidades na resina e favorecendo a formação do biofilme (17). Esta susceptibilidade à colonização por agentes patogênicos, principalmente a *Candida albicans* é a principal desvantagem da prótese confeccionada em PMMA, pois a estomatite protética associada ao gênero *Candida* é uma condição complexa, devido à desinfecção incompleta da base da prótese, porosidade e à rápida recolonização microbiana (3).

As células de defesa do corpo humano, como neutrófilos, monócitos e macrófagos desempenham importante função em eliminar infecções por *Candida albicans*, porém, quando há algum desequilíbrio nas funções dessas células ocorre a infecção (18). A primeira linha de defesa do sistema imune contra a infecção por *Candida* é representada por neutrófilos e macrófagos, os primeiros eliminam os fungos por fagocitose, enquanto que os macrófagos/monócitos atuam como células-chave da resposta celular produzindo as citocinas, como a IL-6, IL-17, TNF- α (6,9).

A resposta imune celular dos indivíduos é avaliada, entre outras formas, pelos níveis de citocinas, tais como: TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12, da detecção de anticorpos, como IgG (IgG1, IgG3, IgG4) e IgE, e dos marcadores de superfície, como CD4, CD8, através de testes e análises específicas. Quando seus níveis se apresentam fora de um padrão determinado deve estar ocorrendo a ativação da resposta imune e da resposta inflamatória (19). Zheng et al. (20) recomenda que os testes iniciais de biocompatibilidade e imunomodulação sejam realizadas nas células da resposta imune, células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC).

Em infecções por *Candida* a resposta imune começa através do reconhecimento de estruturas químicas do invasor, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células de defesa, como CD206, TLR2, TLR4 e Dectin-1, após esse reconhecimento, a resposta imune inata resulta em fagocitose e morte do patógeno, liberação de citocinas que ativam a resposta imune adaptativa específica e conseqüente eliminação da infecção, por isso, o controle da *C. albicans* na cavidade oral é fundamental para que não ocorra infecção sistêmica (21).

O tratamento tradicional para estomatite inclui o uso de agentes antifúngicos; estes, por sua vez, parecem úteis, mas se não houver eliminação das hifas de *Candida albicans* da prótese, a recorrência da doença será uma constante (22). Em contrapartida, o amplo uso dos antifúngicos pode levar à resistência microbiana, promovendo o fracasso nas terapias convencionais. Isto ocorre porque biofilmes são comunidades microbianas bem estruturadas onde as células fúngicas estão incorporadas dentro de uma matriz extracelular (MEC), tornando-se consideravelmente mais tolerante às terapias antifúngicas. Desta forma os biofilmes são considerados um fator de virulência (23).

Outros tratamentos sugeridos para estomatite incluem o uso de soluções químicas desinfetantes, terapias com laser, fitoterapia e ainda a confecção de novas próteses (11,24,25). No entanto, nenhum destes tratamentos citados parecem ser completamente eficazes. Pesquisas mais atuais vem sendo desenvolvidas no intuito de melhorar as propriedades químicas, mecânicas e atividade antimicrobiana das resinas acrílicas de PMMA através da incorporação de íons ou nanopartículas no processo da confecção das próteses, tais como: a incorporação de nanopartículas de platina (24), nanopartículas de prata (26–31), nanoestruturas de vanadato de prata (32), nanopartículas de titânio (17), óxidos metálicos nanoparticulados (33) entre outras.

Substâncias como as nanopartículas de prata agem como agentes antibacterianos interagindo diretamente com microrganismos, promovendo alterações morfológicas e estruturais nas células bacterianas (29,34) Essas partículas são, na maioria dos estudos, sugeridas como não tóxicas às células humanas, embora, devido à sua pequena dimensão e propriedades variáveis, são consideradas como perigosas para o ambiente (35). Já o vanadato de prata é um material alternativo para uso em saúde, uma vez que evita a aglomeração de nanopartículas, proporcionando alto contato com os microrganismos e maior atividade microbiana (32).

Outro biomaterial que vem sendo utilizado em experimentos científicos por possuir atividade antimicrobiana é o Cério (Ce), elemento químico da família dos lantanídeos, terras raras, existente em grande abundância na atmosfera (23). Pesquisas com o nitrato de cério associado a outros

compostos, como por exemplo a sulfadiazina de prata, já mostraram sua eficácia no tratamento de queimaduras (36).

Silva-Dias et al. (23) descreveram que o nitrato de cério, frente ao microrganismo, entra no citoplasma inibindo a respiração celular e o metabolismo da glicose ocasionando a ruptura da membrana celular, o que não ocorre em células humanas, onde o nitrato de cério comporta-se de maneira fisiológica, isto é, sem comprometer as funções celulares.

Desta forma, as propriedades farmacológicas do nitrato de cério estão estabelecidas (36). Sua atividade antimicrobiana contra células planctônicas rompendo a membrana e/ou a parede celular da *Candida albicans* tem sido demonstrado, além da atividade de antiadesão e antibiofilmes (23).

Freire (37) observou a eficácia do nitrato de cério contra diversas espécies de *Candida*, inclusive a mesma cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028) utilizada por Silva-Dias et al. (23), além de demonstrar a eficácia contra biofilmes de *C. albicans* pré-formados (redução do biofilme entre 63% a 92% da biomassa total).

Estudos *in vitro* como os de Braydich-Stolle et al. (35), Greulich et al. (38), Suresh-Babu et al. (39) foram realizados para determinar a citotoxicidade e a imunomodulação causadas por vários biomateriais, onde são coletadas células do sangue humano para realização dos experimentos. Os tipos celulares mais utilizados são as PBMC, do inglês (*Peripheral Blood Mononuclear Cell* – células mononucleares do sangue periférico), que são os linfócitos, monócitos e macrófagos, células importantes do sistema imunológico (40). Greulich et al. (38), em seu estudo com nanopartículas de prata, também utilizaram as células mononucleares do sangue periférico em testes de citotoxicidade.

Suresh-Babu et al. (39) testaram a atividade antimicrobiana e citotóxica de nanopartículas de cério (CeO_2) associadas ao ouro (Au/CeO_2) sobre macrófagos normais e células cancerosas do pulmão resultando em uma melhor seletividade do Au/CeO_2 para células cancerosas dependendo da concentração do CeO_2 , além de demonstrar biocompatibilidade melhor do que o ouro (Au) sozinho.

Diante da elevada prevalência da estomatite protética associada à frequente resistência microbiana, a ineficácia, alto custo e efeitos colaterais ao organismo de alguns agentes antimicrobianos convencionais, surgiu o interesse de se desenvolver materiais eficientes no combate a infecções fúngicas no processo de confecção das próteses como forma de tratamento alternativo para infecções por *Candida albicans* na cavidade oral. Nesse contexto, estudos como o de Silva-Dias et al. (23) e Freire (37) sobre a atividade antimicrobiana do nitrato de cério foram realizados, comprovando boa atividade antifúngica.

Desta forma, o presente estudo, sem precedentes, propõe-se avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade e a imunomodulação de diferentes proporções do Nitrato de Cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis sobre leucócitos isolados do sangue de humano.

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido, após a finalização de todos os experimentos, para publicação no periódico “Acta Biomaterialia”.

ABSTRACT

Introduction: Several studies have been developed to improve the mechanical, physical, antimicrobial and biocompatibility characteristics of poly (methyl methacrylate) (PMMA) resins used for dental prosthesis based on the incorporation of biomaterials. Cerium nitrate has application in the treatment of burns and has antimicrobial effect against *C. albicans*. A new therapeutic strategy for denture stomatitis, based on the incorporation of a biomaterial is relevant for clinical practice. In this context, the immunomodulatory activity of cerium nitrate incorporated into the resins has not been investigated yet. **Aim:** to evaluate, in vitro, the biocompatibility and immunomodulation of cerium nitrate incorporated in microwave heat-cured acrylic resins on leukocytes isolated from human blood. **Method:** Cytotoxicity was assessed using alamarBlue® on human PBMC isolated from the blood through the Ficoll Paque protocol. Data were tabulated through the Kruskal Wallis test with Tukey post hoc ($\alpha=0.05$). **Results:** The viability of PBMC in the presence of cerium nitrate solution was shown to be dose-dependent (3250 $\mu\text{g} / \text{ml}$ - 98.55% and 6500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ - 16.61%). In the presence of the test specimens, the cellular viability of PBMC was not reduced at the incorporated concentrations studied compared to the control group. **Conclusion:** The isolated solution of cerium nitrate did not show cytotoxicity against PBMC cells up to 3250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. When incorporated in thermopolymerizable acrylic resin, it did not present cytotoxicity to PBMC isolated from human blood at the two concentrations studied (16xCIM and 32xCIM).

Keywords: cerium, polymethyl methacrylate, immunomodulation.

1. INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma desordem muito comum que afeta usuários de prótese bucal, afetando entre 15 a 70% dos indivíduos acima de 65 anos, especialmente aqueles usuários de próteses totais, caracterizando-se como um processo inflamatório nas áreas mucosas que são cobertas pela prótese apresentando, geralmente, eritemas (1–4). Embora seja reconhecidamente de etiologia multifatorial, envolvendo fatores locais e sistêmicos, a etiologia da EP é fortemente associada à presença de fungos do gênero *Candida* spp., presentes na superfície da prótese e/ou mucosa. (5,6). Fatores locais importantes são os fatores relacionados com as próteses, como trauma, má higiene, uso noturno ou falta de retenção e estabilidade, além da presença de rugosidades e porosidades na superfície e interior das próteses dentárias à base de resina acrílica (3,4,6,7).

As células de defesa do corpo humano, como neutrófilos, monócitos e macrófagos desempenham importante função em eliminar infecções por *Candida albicans*, porém, quando há algum desequilíbrio nas funções dessas células ocorre a infecção (8). A primeira linha de defesa do sistema imune contra a infecção por *Candida* é representada por neutrófilos e macrófagos. Os primeiros eliminam os fungos por fagocitose, enquanto que os macrófagos/monócitos atuam como células-chave da resposta celular produzindo as citocinas, como por exemplo, a IL-6, IL-17, TNF- α (4,6).

A resposta imune contra a infecção por *Candida* começa através do reconhecimento de estruturas químicas do invasor, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células de defesa, como CD206, TLR2, TLR4 e Dectin-1, após esse reconhecimento, a resposta imune inata resulta em fagocitose e morte do patógeno, liberação de citocinas que ativam a resposta imune adaptativa específica e consequente eliminação da infecção, por isso, o controle da *C. albicans* na cavidade oral é fundamental para que não ocorra infecção sistêmica (9).

A resina acrílica de poli (metil metacrilato) (PMMA) é o material de primeira escolha para a confecção das próteses totais, parciais removíveis,

próteses totais sobre implantes e diversos tipos de aparelhos ortodônticos removíveis, por ser de fácil manipulação, baixo custo, reproduzir a forma, tamanho e cor dos tecidos bucais, além de ser biocompatível e possuir propriedades químicas e mecânicas adequadas (10,11). Pesquisas mais atuais vem sendo desenvolvidas no intuito de melhorar as propriedades químicas, mecânicas e atividade antimicrobiana das resinas acrílicas de PMMA através da incorporação de íons ou nanopartículas no processo da confecção das próteses, tais como: a incorporação de nanopartículas de platina (12), nanopartículas de prata (13–18), nanoestruturas de vanadato de prata (19), nanopartículas de titânio (20), óxidos metálicos nanoparticulados (21) entre outras.

Outro biomaterial que vem sendo utilizado em experimentos científicos por possuir atividade antimicrobiana é o Cério (Ce), elemento químico da família dos lantanídeos, terras raras, existente em grande abundância na crosta terrestre (22). Pesquisas com o nitrato de cério associado a outros compostos, como por exemplo a sulfadiazina de prata, já mostraram sua eficácia no tratamento de queimaduras (23). Silva-Dias et al. (22) descreveu que o nitrato de cério, frente ao microrganismo, entra no citoplasma inibindo a respiração celular e o metabolismo da glicose ocasionando a ruptura da membrana celular, o que não ocorre em células humanas, onde o nitrato de cério comporta-se de maneira fisiológica, isto é, sem comprometer as funções celulares.

Desta forma, as propriedades farmacológicas do nitrato de cério estão sendo estabelecidas (23). Sua atividade antimicrobiana contra células planctônicas rompendo a membrana e/ou a parede celular da *Candida albicans* tem sido demonstrada, além de demonstrar também atividade de antiadesão e antibiofilmes (22). Recentemente, o nitrato de cério foi incorporado em resinas acrílicas e demonstrou bom potencial de inibir a formação de biofilme de *Candida Albicans*, além de não ter prejudicado de forma significativas as propriedades físicas do material produzido (24)

O presente estudo, sem precedentes, propõe-se avaliar, *in vivo*, a citotoxicidade e a imunomodulação de diferentes proporções do Nitrato de

Cério incorporado em uma resina acrílica termopolimerizável sobre leucócitos isolados do sangue de humano.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi submetido, através da Plataforma Brasil, ao Comitê de Ética e pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Paraíba com número de protocolo de aceitação: 76628817.0.0000.5188, de acordo com a resolução 466/12 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP). Os corpos de prova (apêndice) foram confeccionados no Laboratório Integrado de Biomateriais (LABIO) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os estudos de investigação da citotoxicidade e imunomodulação foram desenvolvidos no Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC), da Escola Técnica em Saúde, CCS-UFPB.

2.2 Preparo das soluções químicas com nitrato de cério

Para o preparo das soluções do nitrato de cério foi utilizado seu precursor hexahidratado - $(\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), de peso molecular 434,23 dissolvido em uma solução a 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (D8418 SIGMA Dimethyl sulfoxide for molecular biology, Sigma-Aldrich Co, USA), em água deionizada, misturado em agitador magnético sem aquecimento (SP-10003/S SPLABOR, São Paulo, Brasil) a 700 RPM por 5 minutos, até dissolução. Foram preparadas 6 soluções de concentrações diferentes, baseadas em um estudo que demonstrou propriedades antimicrobianas do nitrato de cério, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (24), a saber: $\frac{1}{2}\text{xCIM}$ (812,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CIM (1625 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2xCIM (3250 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4xCIM (6500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 16xCIM (26000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e 32xCIM (52000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sendo as 4 primeiras usadas na avaliação do efeito da solução pura sobre os PBMC e as duas últimas forma incorporadas aos corpos-de-prova em PMMA.

2.3 Confeção dos corpos de prova de resina acrílica de PMMA

Matrizes cilíndricas de aço inox (4x6mm) foram fixadas sobre 1 placa de vidro, incluídas no interior de mufas de fibra de vidro (STG, Vipi, São Paulo, Brasil), com gesso comum e silicone laboratorial (Zetalabor, Zhermack, Badia Polesine, Itália), de maneira convencional.(24)

A resina termopolimerizável por micro-ondas (Vipi wave cor rosa médio, Vipi, São Paulo, Brasil) foi proporcionada segundo as instruções do fabricante. O grupo controle (n=9) foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante (6,5ml /14g) e incluída, prensada (1 Tonelada/20 minutos) e polimerizada em micro-ondas (Perfect 800W, Panasonic, Japão) segundo o ciclo do fabricante (20 min/20% da potência máxima, 5 min/60% potência máxima). Aguardou-se o resfriamento à temperatura ambiente para remoção dos corpos-de-prova, que passaram por acabamento com lixas d'água (200, 400, 600 e 1200) e polimento com disco de feltro e pasta de alumina, seguidos por banho ultrassônico (15 minutos) e esterilização por óxido de etileno (Sete Serviços de Esterilização, Cabedelo, Paraíba, Brasil).

Corpos de prova de dois grupos experimentais (n=9) foram confeccionados, incorporando 20% das soluções mais concentradas (16xCIM e 32xCIM) para cada 1 ml de monômero, previamente à polimerização, buscando-se dessa forma estabelecer pelo menos uma concentração equivalente à CIM e 2xCIM para cada mm³ do material produzido.(24) Todos os demais passos seguiram os estabelecidos para o grupo controle.

2.4 Isolamento das células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico

Foram coletados 12 ml do sangue periférico de três voluntários saudáveis, pareados em gênero e idade, esta variando de 18 a 40 anos que aceitaram participar do estudo por meio do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) em anexo, momentos antes do ensaio, através de punção venosa à vácuo com frascos plásticos heparinizados estéreis (Vacutainer Becton Dickinson). Foram excluídos indivíduos alérgicos a quaisquer tipos de

substâncias utilizadas; fumantes e etilistas; pacientes com discrasias sanguíneas, imunodeficiências e neoplasias malignas; ou que possuíssem histórico de doenças crônicas (como asma e diabetes), infectocontagiosas (hepatite, AIDS, entre outras), alérgicas ou inflamatórias.

As PBMC foram isoladas pelo protocolo de duplo gradiente de Ficoll-Paque™ 1077 e 1119 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) de acordo Castellano et al. (25). Brevemente, após centrifugação a 400g e 20°C por 30 minutos do sangue com Ficoll nas duas densidades, as camadas leucocitárias foram coletadas com pipetas de Pasteur, postas em tubos falcon de 15 ml e lavadas três vezes com tampão de fosfato (PBS) com centrifugação a 300g por 10 minutos. As células foram suspendidas em alíquotas de 2×10^6 cél/ml em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com soro fetal bovino (5%), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 1mM HEPES. Em seguida, a quantificação do número de células viáveis foi realizada pelo método de exclusão do azul de trypan 0,4% (Sigma-Aldrich®). Alíquotas de 50µL das células foram diluídas com 50µL do corante azul de tripan (0,4%), após 10 minutos, o número de células viáveis foi quantificado em câmara de Neubauer através de contador eletrônico de células, Countess II FL Automated Cell Counter – LIFE, fazendo-se a contagem de células mortas (coradas) e células íntegras (não coradas).

Os testes foram realizados em triplicata, para a citotoxicidade. Sendo as células coletadas de cada doador repetidos em experimentos independentes.

2.5 Ensaio de citotoxicidade das PBMC

Em um primeiro momento realizou-se o ensaio de citotoxicidade com as soluções preparadas contendo concentrações do nitrato de cério de $\frac{1}{2} \times \text{CIM}$ (812,5 µg/mL), CIM (1625 µg/ml), $2 \times \text{CIM}$ (3250 µg/ml), $4 \times \text{CIM}$ (6500 µg/ml) com o propósito de definir a concentração do nitrato de cério em solução não-citotóxica às PBMC.

A viabilidade celular foi realizada alíquotando-se 100 µL de suspensão de PBMC que foram estimuladas com 5µg / ml de fitohemaglutinina (PHA-P; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em placas de fundo plano de 96 poços de

poliestireno preto (Greiner Bio-One, EUA) e incubadas em meio de cultura com as diferentes concentrações do nitrato de cério: 812,5 µg/mL, 1625 µg/mL, 3250 µg/mL, 6500 µg/mL durante 24 horas a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. O controle negativo foi representado por células não estimuladas e controle positivo por células estimuladas com o DMSO. A citotoxicidade celular foi medida usando alamarBlue® de acordo com o protocolo do kit (Bio-Rad, Hercules, EUA). Os corpos de prova de cada grupo foram inseridos na placa de 96 poços juntos com as PBMC e, em seguida, incubados durante 24 horas. Após esse tempo adicionou-se 20 µL de resazurina para avaliar a viabilidade das PBMC, seguindo o mesmo protocolo utilizado para avaliar a citotoxicidade das soluções. Se a resazurina for convertida em resofurina (o que altera a coloração da solução) indica que as PBMC, frente aos corpos de prova incorporados com o nitrato de cério, não apresentaram citotoxicidade. Em seguida, uma nova incubação foi realizada por 10 horas. Decorrido esse tempo, realizou-se a leitura da placa no leitor de microplacas. A fluorescência foi medida no GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega, Madison, EUA) e a porcentagem de viabilidade foi calculada da seguinte forma: Citotoxicidade (%) = [(FI 590 de amostras tratadas / FI 590 de células não tratadas) (100)] Onde: FI 590 = Intensidade Fluorescente a uma emissão de 590 nm (excitação de 560 nm).

Em um segundo momento o mesmo ensaio de citotoxicidade foi realizado, agora com os grupos dos corpos de prova em resina acrílica incorporados com o nitrato de cério nas concentrações de 16xCIM (26000 µg/ml) e 32xCIM (52000 µg/ml). O controle negativo foi representado por células não estimuladas e o controle positivo foi representado pelo corpo de prova confeccionado só em resina acrílica, sem incorporação.

Este ensaio de citotoxicidade celular foi realizado em triplicata de 3 voluntários sendo necessários então de 9 corpos de prova para cada grupo.

2.6 Análise dos dados

Os dados foram expressos em média e desvio-padrão (DP) em todos os ensaios e a determinação das diferenças significativas entre os grupos experimentais para a citotoxicidade celular foi realizada através do teste de Kruskal Wallis com o *post hoc* de Tukey ($\alpha = 0,05$), para uma distribuição não-normal, de acordo com o teste de Shapiro-wilk. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad versão 7.00. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (nível de significância de 95%).

3. RESULTADOS

3.1 Citotoxicidade celular das PBMC frente à solução de nitrato de cério

Os valores apresentados na **Figura 1** demonstram que a viabilidade celular das PBMC foi de 98,55% nas soluções com a concentração de nitrato de cério até 3250 $\mu\text{g/mL}$ (2XCIM). Valores acima dessa concentração diminuem, significativamente, a viabilidade celular das PBMC, com uma porcentagem de células vivas igual a 16,61% na concentração de 6500 $\mu\text{g/mL}$, sendo excluída dos próximos experimentos (nitrato de cério incorporado à resina acrílica) concentrações maiores que 3250 $\mu\text{g/mL}$ (2XCIM).

3.2 Citotoxicidade celular das PBMC na presença dos corpos de prova

Não foi observada redução da viabilidade celular, isto é, nenhum efeito tóxico nas concentrações dos grupos testes comparados aos grupos controle foi apresentado pelas células testadas, mostrando ainda que o grupo que continha a maior concentração da solução de nitrato de cério 32XCIM (52000 $\mu\text{g/ml}$), obteve a viabilidade das PBMC bastante semelhante com o grupo controle da resina acrílica, como mostra a **Figura 2**.

O grupo controle (DMSO) apresentou menor viabilidade quando comparado com os outros grupos, com 58,27% de células viáveis. O grupo controle (resina) foi composto por 95,74% de células viáveis, o grupo (16xCIM) obteve 78,03% de PBMC viáveis e o grupo (32xCIM) foi representado por 99,48% de células viáveis.

4. DISCUSSÃO

A utilização do nitrato de cério como agente terapêutico vem sendo embasada por estudos que apontam sua atividade antimicrobiana e sua viabilidade frente às células humanas, (22,23,26,27). Enquanto que em bactérias e fungos o nitrato de cério é absorvido nos seus citoplasmas, comprometendo suas funções metabólicas; nas células humanas parecem não causar efeitos citotóxicos, promovendo um impacto mínimo do metabolismo celular, mantendo a membrana celular intacta (22). Com isso, o efeito não tóxico do nitrato de cério e sua propriedade antimicrobiana viabilizam sua utilização em pesquisas visando sua possível utilização clínica como agente antimicrobiano.

No presente estudo, foi determinada, inicialmente, a concentração máxima do nitrato de cério hexahidratado ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) que não causasse citotoxicidade nas células humanas testadas (PBMC). Partiu-se da referência da CIM estabelecida por estudo prévio (24), a partir da qual foram formuladas 6 diferentes soluções, 4 menos concentradas ($\frac{1}{2}$ xCIM, CIM, 2xCIM e 4xCIM), que foram utilizadas puras no ensaio de citotoxicidade e duas mais concentradas (16xCIM e 32xCIM), que foram incorporadas em uma concentração de 20% (0,2 ml para cada 1ml de monômero) aos corpos-de-prova em PMMA, buscando-se atingir pelo menos uma concentração equivalente à CIM e 2xCIM para cada mm^3 do material produzido.(24) Verificou-se que, em relação às soluções, redução visível da citotoxicidade foi encontrada na solução de 4xCIM, quando comparadas aos demais grupos.

Em relação aos grupos de nitrato de cério incorporados nos corpos de prova de resina acrílica, houve pequeno efeito citotóxico no grupo controle

(95,74% de células viáveis) e nos grupos com nitrato de cério, apresentando uma porcentagem de 78,03% de células viáveis para o grupo (16xCIM) e 99,48% no grupo (32xCIM), sendo um ótimo resultado para o estudo, já que quanto maior a concentração de nitrato de cério maior eficácia antimicrobiana é apresentada, de acordo com Freire (2017).

A porcentagem de células viáveis apresentada no grupo controle, provavelmente não é de 100%, pois segundo Jorge et al. (28) a própria resina acrílica, devido à liberação de monômeros residuais, apresenta potencial de citotoxicidade.

O nitrato de cério já vem sendo utilizado para o tratamento de queimaduras associado à sulfadiazina de prata (23). Garner, Heppell (36) demonstraram que o cério reduz a mortalidade e a morbidade no tratamento de queimaduras graves. Esse benefício é derivado de sua ação na queima de escara. Ele se liga e desnatura o complexo de proteína lipídica liberado na pele queimada que é responsável pela imunossupressão profunda associada a queimaduras cutâneas maiores.

Segundo Deveci et al. (23) o tratamento com nitrato associado à sulfadiazina de prata tem melhorado a sobrevivência em pacientes que sofreram queimaduras, aumentando assim as estatísticas de sobrevivência destes pacientes. Silva-Dias et al. (22) explica que o nitrato de cério tem a capacidade de diminuir os níveis de citocinas e ativação de leucócitos, evitando a formação do edema da queimadura.

Estudos relataram que em muitas pesquisas experimentais e clínicas o ferimento térmico provoca imunossupressão, liberando citocinas, tais como: TNF- α e IL-6, conhecidas por induzir a inflamação aguda. Essa imunossupressão pode ser abrandada com o banho de nitrato de cério, pois este se liga aos complexos de proteínas lipídicas que originam a queimadura, portanto, o nitrato de cério evita a elevação dos níveis de TNF- α , assim como a IL-6 diminui os níveis de TNF- α , diminuindo assim a severidade da resposta interna no período inicial da lesão (23). Os biomateriais podem modificar a imunidade adaptativa induzindo o reparo tecidual após a lesão, sendo a modulação da resposta imune bastante relevante em terapias regenerativas (37).

A utilização do nitrato de cério sobre queimaduras apresenta eficácia reduzindo a inflamação aguda. Seu efeito biológico nas células humanas do sangue continua ser pesquisado. Neste estudo, o nitrato de cério apresentou-se como um biomaterial viável para ser incorporado nas resinas acrílicas utilizadas para confecção de próteses dentárias, não apenas pelo seu efeito biológico, mas também por possuir atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans*, principal patógeno na cavidade oral relacionado com a estomatite protética.

5. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que o nitrato de cério em solução não apresenta citotoxicidade frente as células PBMC isoladas do sangue humano até a concentração de 3250 µg/mL. Quando incorporada na resina acrílica termopolimerizável, não apresentou citotoxicidade frente as células PBMC isoladas do sangue humano nas duas concentrações estudadas (16xCIM e 32xCIM). Novos estudos *in vitro* com outros tipos celulares, bem como estudos em animais e posteriormente ensaios clínicos são necessários para determinar o papel do nitrato de cério frente as células da resposta imune e tornar viável sua incorporação nas resinas acrílicas para uso terapêutico.

6. APÊNDICES

A.1.

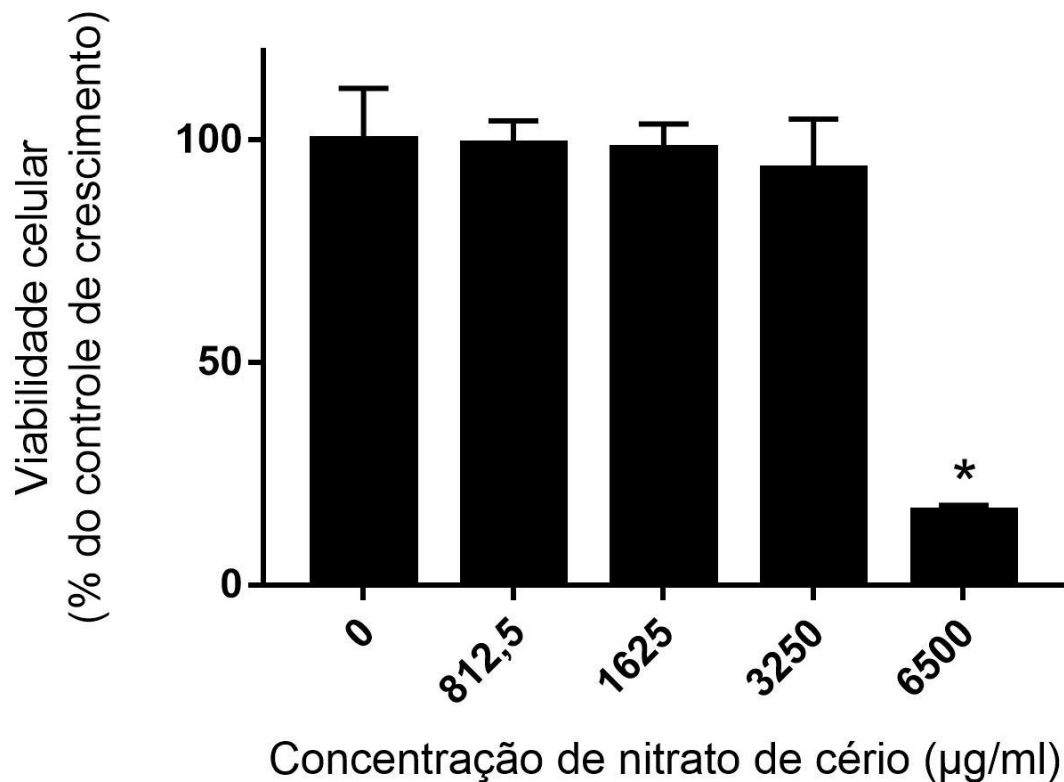


Figura 01 – Efeito da solução de nitrato de cério hexahidratado ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ + DMSO) na viabilidade celular das PBMC. A viabilidade celular foi medida usando alamarBlue® de acordo com o protocolo do kit (Bio-Rad, Hercules, EUA). Os dados são representados pelas médias através das barras e as linhas verticais representam os desvios-padrões dos grupos testados com concentrações diferentes. O asterisco (*) indica diferença significativa em comparação com o controle negativo (Kruskal Wallis com o post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$)).

A.2.

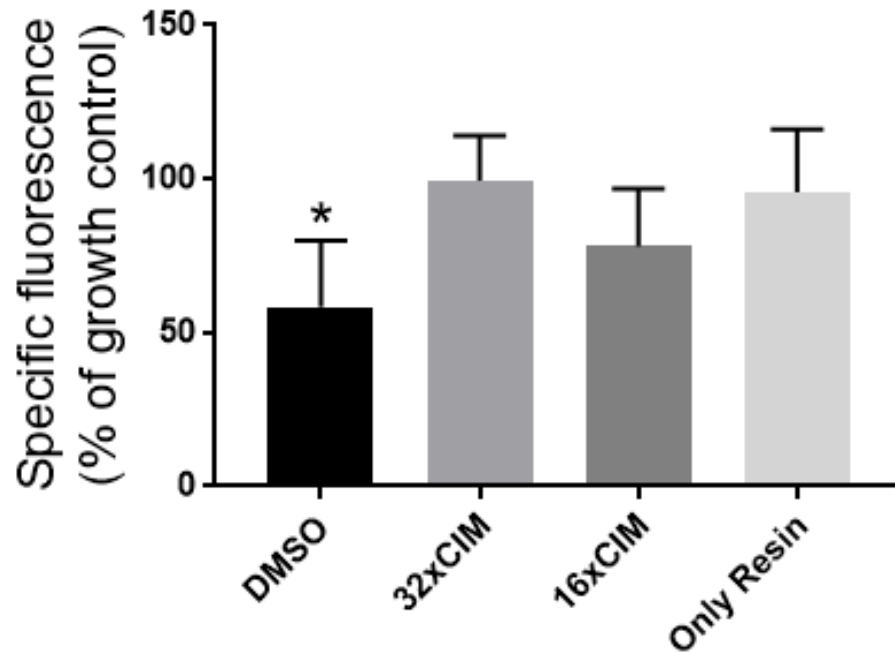


Figura 02 – Efeitos das concentrações do nitrato de cério hexahidratado ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) incorporado às resinas acrílicas termopolimerizáveis sobre a viabilidade das PBMC. As células foram tratadas com diferentes concentrações do ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) durante 24 h sob condições de cultura de células. A toxicidade celular foi determinada medindo a intensidade média de fluorescência da resazurina. Os dados são expressos em média \pm DP. O asterisco indica diferença estatística significativa do controle ($p < 0,05$).

7. REFERÊNCIAS

1. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251–60.
2. Figueiral MH, Fonseca P, Lopes MM, Pinto E, Pereira-Leite T, Sampaio-Maia B. Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. *Open Dent J [Internet]*. 2015 Jan 30;9(1):46–51.
3. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J [Internet]*. Australia; 1998 Jun;43(3):160–6.
4. Maciąg J, Mikołajczyk T, Matusik P, Nosalski R, Sagan A, Maciąg A, et al. Systemic T Cells and Monocyte Characteristics in Patients with Denture Stomatitis. *J Prosthodont [Internet]*. 2017 Jan;26(1):19–28.
5. Ercalik-Yalcinkaya S, Ozcan M. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *J Prosthodont*. United States; 2015 Jun;24(4):271–8.
6. Pinke KHH, Freitas P, Viera NAA, Honório HMM, Porto VCC, Lara VSS. Decreased production of proinflammatory cytokines by monocytes from individuals presenting *Candida*-associated denture stomatitis. *Cytokine [Internet]*. Elsevier Ltd; 2016;77:145–51.
7. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007;34(8):606–12.
8. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol [Internet]*. Nature Publishing Group; 2015 Sep 21;15(10):630–42.
9. Gasparoto THH, de Oliveira CEE, Vieira NAA, Porto VCC, Gasparoto CTT, Campanelli APP, et al. The pattern recognition receptors expressed on neutrophils and the associated cytokine profile from different aged patients with *Candida*-related denture stomatitis. *Exp Gerontol [Internet]*.

- Elsevier Inc.; 2012 Sep;47(9):741–8.
10. Goiato MC, Freitas E, dos Santos D, De Medeiros R, Sonogo M. Acrylic resin cytotoxicity for denture base - Literature review. *Adv Clin Exp Med* [Internet]. 2015;24(4):679–86.
 11. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent. The Editorial Council of the Journal of Prosthetic Dentistry*; 2009;101(3):205–13.
 12. Nam K-Y. Characterization and bacterial anti-adherent effect on modified PMMA denture acrylic resin containing platinum nanoparticles. *J Adv Prosthodont*. 2014;6(3):207–14.
 13. El-Aassar MR, Hafez EE, Fouda MMG, Al-Deyab SS. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of poly(acrylonitrile-co-methyl methacrylate) with silver nanoparticles. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;171(3):643–54.
 14. Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24(5):2051–6.
 15. Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology*. 2016;33(2):209–16.
 16. Lyutakov O, Goncharova I, Rimpelova S, Kolarova K, Svanda J, Svorcik V. Silver release and antimicrobial properties of PMMA films doped with silver ions, nano-particles and complexes. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;49:534–40.
 17. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho ACR, Barbosa DB. Silver Distribution and Release from an Antimicrobial Denture Base Resin Containing Silver Colloidal Nanoparticles. *J Prosthodont*. 2012;21(1):7–15.
 18. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol*. 2012;112(6):1163–72.

19. de Castro DT, Holtz RD, Alves OL, Watanabe E, Valente ML, da Silva CH, et al. Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2014;22(5):442–9.
20. Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: A research composition and update. *J Prosthodont*. 2014;23(4):284–90.
21. Allaker RP. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *J Dent Res* [Internet]. 2010;89(11):1175–86.
22. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Cobrado L, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, et al. In vitro antifungal activity and in vivo antibiofilm activity of cerium nitrate against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2015 Jan 3;70:1083–93.
23. Deveci M, Eski M, Sengezer M, Kisa U. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL-6 and TNF- α levels in burned rats. *Burns* [Internet]. 2000 Feb;26(1):41–5.
24. Freire IC de M. Efeito da Incorporação do Nitrato de Cério na atividade antifúngica e propriedades físico-mecânicas de Resinas Acrílicas Termopolimerizáveis [Dissertação - Mestrado em Odontologia - Área de Ciências Odontológicas]. [João Pessoa, Brasil]: Universidade Federal da Paraíba - UFPB; 2017.
25. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Hum Immunol* [Internet]. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2009;70(6):383–90.
26. Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(5):1159–62.
27. Suresh Babu K, Anandkumar M, Tsai TY, Kao TH, Stephen Inbaraj B, Chen BH. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):5515–31.
28. Jorge J, Giampaolo E, Machado A, Vergani C. Cytotoxicity of denture

- base acrylic resins:a literature review. *J Prosthet Dent*. 2003;90:190–3.
29. Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* [Internet]. 2011;3(4):1411.
 30. Dowding JM, Seal S, Self WT. Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite (ONOO⁻). *Drug Deliv Transl Res*. 2013;3(4):375–9.
 31. Dupre-Crochet S, Erard M, Nusse O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol* [Internet]. 2013;94(4):657–70.
 32. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1493–505.
 33. Caputo F, Mameli M, Sienkiewicz A, Licocchia S, Stellacci F, Ghibelli L, et al. A novel synthetic approach of cerium oxide nanoparticles with improved biomedical activity. *Sci Rep*. Springer US; 2017;7(1):1–13.
 34. Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanocerium. *Biomaterials*. 2008;29(18):2705–9.
 35. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, et al. Nanocerium exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun* [Internet]. 2010;46(16):2736.
 36. Garner JP, Heppell PSJ. Cerium nitrate in the management of burns. *Burns*. 2005. p. 539–47.
 37. Sadtler K, Estrellas K, Allen BW, Wolf MT, Fan H, Tam AJ, et al. Developing a pro-regenerative biomaterial scaffold microenvironment requires T helper 2 cells. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Apr 15;352(6283):366–70.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolvimento deste trabalho iniciou-se com o preparo das soluções de nitrato de cério hexahidratado e a confecção dos corpos de prova com e sem incorporação de tal biomaterial.

Em seguida foi realizado o ensaio piloto para determinar a concentração do nitrato de cério viável frente às PBMC. Esse ensaio consistiu em verificar a concentração do nitrato de cério que permitisse a viabilidade celular das PBMC do sangue humano isoladas. Foi seguido um protocolo de citotoxicidade baseado na redução de resazurina em resofurina. As soluções, em diferentes concentrações, foram incubadas com as PBMC e a viabilidade celular foi verificada através do kit alamarblue, apresentando-se satisfatória até a concentração de 3250 $\mu\text{L/mL}$. Esse resultado viabiliza a incorporação do nitrato de cério nas concentrações com atividade antifúngica contra *C. albicans*, encontradas em estudo prévio de Freire (37).

No teste de citotoxicidade dos corpos de prova em resina acrílica incorporados com o nitrato de cério nenhum efeito citotóxico foi observado nos grupos com nitrato de cério, apresentando uma porcentagem de 78,03% de células viáveis para o grupo (16xCIM) e 99,48% no grupo (32xCIM). Com isso, acredita-se que o nitrato de cério não interfira no metabolismo fisiológico das PBMC.

É sabido que diversos biomateriais vêm sendo utilizados em pesquisas médicas, incorporados ou não a outros materiais. O próprio nitrato de cério já é utilizado na prática clínica para o tratamento de queimaduras, o que leva a uma investigação maior de sua ação e sua futura utilização para outras patologias humanas.

Ensaio mais específicos, como ensaios de imunofenotipagem, determinação do seu mecanismo de liberação, ensaios em macrófagos, ensaios de fagocitose, estudos *in vivo* e posteriormente ensaios clínicos são necessários para determinar o papel do nitrato de cério e seu completo entendimento para o uso terapêutico.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados concluiu-se que:

1. A solução isolada do nitrato de cério não apresenta citotoxicidade frente as células PBMC isoladas do sangue humano até a concentração de 3250 µg/ml.
2. A solução isolada do nitrato de cério incorporada em resinas acrílicas termopolimerizáveis não apresentou citotoxicidade frente as células PBMC isoladas do sangue humano nas duas concentrações estudadas (16xCIM e 32xCIM).
3. Novos estudos *in vitro* com outros tipos celulares, bem como estudos em animais e posteriormente ensaios clínicos são necessários para determinar o papel do nitrato de cério frente as células da resposta imune e tornar viável sua incorporação nas resinas acrílicas para uso terapêutico.

4. REFERÊNCIAS

1. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251–60.
2. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by Candida species. *Aust Dent J* [Internet]. Australia; 1998 Jun;43(3):160–6.
3. Raj PA, Dentino AR. Denture polymers with antimicrobial properties: a review of the development and current status of anionic poly(methyl methacrylate) polymers. *Future Med Chem* [Internet]. 2013 Sep;5(14):1635–45.
4. Gantait S, Bhattacharyya J, Das S, Biswas S, Ghati A, Ghosh S, et al. Comparative assessment of the effectiveness of different cleaning methods on the growth of *Candida albicans* over acrylic surface. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(3):336.
5. Hilgert JB, Giordani JM do A, de Souza RF, Wendland EMDR, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Geriatr Soc* [Internet]. 2016 Dec;64(12):2539–45.
6. Pinke KHH, Freitas P, Viera NAA, Honório HMM, Porto VCC, Lara VSS. Decreased production of proinflammatory cytokines by monocytes from individuals presenting Candida-associated denture stomatitis. *Cytokine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;77:145–51.
7. BRASIL, Ministério da Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília; 2012.
8. Figueiral MH, Fonseca P, Lopes MM, Pinto E, Pereira-Leite T, Sampaio-Maia B. Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. *Open Dent J* [Internet]. 2015 Jan 30;9(1):46–51.
9. Maciąg J, Mikołajczyk T, Matusik P, Nosalski R, Sagan A, Maciąg A, et al. Systemic T Cells and Monocyte Characteristics in Patients with Denture Stomatitis. *J Prosthodont* [Internet]. 2017 Jan;26(1):19–28.
10. Ercalik-Yalcinkaya S, Ozcan M. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *J Prosthodont*. United States; 2015 Jun;24(4):271–8.
11. Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007;34(8):606–12.
12. Goiato MC, Freitas E, dos Santos D, De Medeiros R, Sonogo M. Acrylic resin cytotoxicity for denture base - Literature review. *Adv Clin Exp Med* [Internet]. 2015;24(4):679–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26469114>
13. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent*. The Editorial Council of the Journal of Prosthetic Dentistry; 2009;101(3):205–13.
14. Jorge J, Giampaolo E, Machado A, Vergani C. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2003;90:190–3.
15. Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran)* [Internet]. 2012;9(4):180–

- 8.
16. Rashid H, Sheikh Z, Vohra F. Allergic effects of the residual monomer used in denture base acrylic resins. *Eur J Dent*. 2015;9(4):614–9.
17. Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: a research composition and update. *J Prosthodont [Internet]*. 2014 Jun [cited 2016 Oct 12];23(4):284–90.
18. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol [Internet]*. Nature Publishing Group; 2015 Sep 21;15(10):630–42.
19. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Hum Immunol [Internet]*. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2009;70(6):383–90.
20. Zheng K, Solodovnyk A, Li W, Goudouri O-MM, Stähli C, Nazhat SN, et al. Aging time and temperature effects on the structure and bioactivity of gel-derived 45S5 glass-ceramics. Bose S, editor. *J Am Ceram Soc [Internet]*. 2015 Jan;98(1):30–8.
21. Gasparoto THH, de Oliveira CEE, Vieira NAA, Porto VCC, Gasparoto CTT, Campanelli APP, et al. The pattern recognition receptors expressed on neutrophils and the associated cytokine profile from different aged patients with *Candida*-related denture stomatitis. *Exp Gerontol [Internet]*. Elsevier Inc.; 2012 Sep;47(9):741–8.
22. McMahan T, Zijl PCM Van, Gilad AA. NIH Public Access. 2015;27(3):320–31.
23. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Cobrado L, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, et al. In vitro antifungal activity and in vivo antibiofilm activity of cerium nitrate against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother [Internet]*. 2015 Jan 3;70:1083–93.
24. Nam K-Y. Characterization and bacterial anti-adherent effect on modified PMMA denture acrylic resin containing platinum nanoparticles. *J Adv Prosthodont*. 2014;6(3):207–14.
25. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2016;25(4):288–301.
26. El-Aassar MR, Hafez EE, Fouda MMG, Al-Deyab SS. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of poly(acrylonitrile-co-methyl methacrylate) with silver nanoparticles. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;171(3):643–54.
27. Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24(5):2051–6.
28. Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology*. 2016;33(2):209–16.
29. Lyutakov O, Goncharova I, Rimpelova S, Kolarova K, Svanda J, Svorcik V. Silver release and antimicrobial properties of PMMA films doped with silver ions, nano-particles and complexes. *Mater Sci Eng C*. Elsevier B.V.; 2015;49:534–40.

30. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho ACR, Barbosa DB. Silver Distribution and Release from an Antimicrobial Denture Base Resin Containing Silver Colloidal Nanoparticles. *J Prosthodont.* 2012;21(1):7–15.
31. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol.* 2012;112(6):1163–72.
32. de Castro DT, Holtz RD, Alves OL, Watanabe E, Valente ML, da Silva CH, et al. Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application. *J Appl Oral Sci [Internet].* 2014;22(5):442–9.
33. Allaker RP. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *J Dent Res [Internet].* 2010;89(11):1175–86.
34. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances.* 2009. p. 76–83.
35. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005;88(2):412–9.
36. Deveci M, Eski M, Sengezer M, Kisa U. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL-6 and TNF- α levels in burned rats. *Burns [Internet].* 2000 Feb;26(1):41–5.
37. Freire IC de M. Efeito da Incorporação do Nitrato de Cério na atividade antifúngica e propriedades físico-mecânicas de Resinas Acrílicas Termopolimerizáveis [Dissertação - Mestrado em Odontologia - Área de Ciências Odontológicas]. [João Pessoa, Brasil]: Universidade Federal da Paraíba - UFPB; 2017.
38. Greulich C, Diendorf J, Geßmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler G, et al. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater [Internet]. Acta Materialia Inc.;* 2011 Sep;7(9):3505–14.
39. Suresh Babu K, Anandkumar M, Tsai TY, Kao TH, Stephen Inbaraj B, Chen BH. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2014;9(1):5515–31.
40. El-Kady AM, Farag MM. Bioactive Glass Nanoparticles as a New Delivery System for Sustained 5-Fluorouracil Release: Characterization and Evaluation of Drug Release Mechanism. *J Nanomater [Internet].* 2015;2015:1–11.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

6. ANEXO

4.1 Autorização do Laboratório de Análise e Cultivo Celular



UFPB

CARTA DE ANUÊNCIA (Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Aceito a pesquisadora Priscilla Kelly Batista da Silva Leite, com responsabilidade de pesquisadora principal, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB pesquisa intitulada “Avaliação imunomoduladora e citotóxica sobre leucócitos humanos do nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis”, sob orientação do Professor Doutor André Ulisses Dantas Batista.

Ciente dos objetivos e da metodologia da pesquisa acima citada, concedo a anuência para seu desenvolvimento da pesquisa no Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC), da Escola Técnica em Saúde, CCS-UFPB, desde que me sejam assegurados os requisitos abaixo:

- O cumprimento das determinações éticas da Resolução nº466/2012 CNS/CONEP.
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa.
- Não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação dessa pesquisa.
- No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma.

João Pessoa

Local

João Pessoa 03 de Junho 2017

Data

Prof. Dr. Lúcio Roberto C. Castellano
Coord. Lab. Análise e Cultivo Celular - LACEN
Curso Técnico em Análises Clínicas
ETS/CCS/UFPB SIAPE 16784185

Assinatura e carimbo do responsável pelo Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC), da Escola Técnica em Saúde, CCS-UFPB.

7.APÊNDICE

7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre a avaliação do perfil imunomodulador do nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis sobre leucócitos humanos, a ser realizada pela aluna Priscilla Kelly Batista da Silva Leite, mestranda em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação dos Professores Doutores André Ulisses Dantas Batista e Lucio Roberto Cançado Castellano.

O intuito deste trabalho é promover o esclarecimento acerca dos efeitos do nitrato de cério sobre as células do sangue humano. Se você concordar em participar deste estudo serão coletadas 1 amostra 12 mililitros de seu sangue a serem submetidos a exames laboratoriais exclusivamente destinado a este estudo. A partir desta amostra serão realizados testes (exames com o sangue) para determinação da toxicidade do nitrato de cério. Os tubos serão codificados, de modo a garantir sigilo sobre a identidade do participante.

A coleta de sangue através de punções venosas para exames laboratoriais com seringas e agulhas descartáveis e estéreis podem, embora sejam raros, resultarem em dor no local da punção, manchas roxas transitórias chamadas de equimoses, desconforto e a possibilidade de infecção. Em caso de danos decorrentes de sua participação no estudo, haverá assistência integral e gratuita.

Os resultados deste estudo serão apresentados os em eventos da área de saúde e publicados em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, será mantido em sigilo sobre os participantes da pesquisa.

A participação no estudo é voluntária e, portanto, não há obrigação de fornecimento de informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não haverá nenhum dano, nem modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Haverá ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo.

Os pesquisadores estarão à disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor contatar o pesquisador: Lúcio Roberto Cançado Castellano Endereço (Setor de Trabalho): Universidade Federal da Paraíba – Campus I / Cidade Universitária - João Pessoa - PB – Brasil, Telefone (83) 3216-7189 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba Campus I - Cidade Universitária - 1º Andar – CEP 58051-900 – João Pessoa/PB. Telefone: (83) 3216-7791 – E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com.

Dados os devidos esclarecidos e, caso haja consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados, favor assinar no campo a baixo. Uma via desse documento será entregue aos voluntários.

_____	___ / ___ / ___	
Assinatura do Participante	dia mês ano	
_____	___ / ___ / ___	
Assinatura de Testemunha, se necessário	dia mês ano	
		impressão dactiloscópica

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

Obs.: O sujeito da pesquisa ou seu representante e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do TCLE apondo suas assinaturas na última página do referido Termo.

7.2 Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP)

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IMUNOMODULADORA E CITOTÓXICA SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS DO NITRATO DE CÉRIO INCORPORADO EM RESINAS ACRÍLICAS TERMOPLIMERIZÁVEIS

Pesquisador: Priscilla Kelly Batista da Silva Leite

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 76628817.0.0000.5188

Instituição Proponente: Centro de Ciência da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.357.308

Apresentação do Projeto:

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de melhorar as características mecânicas, físicas, antimicrobianas e citotóxicas das resinas acrílicas de poli (metil metacrilato) (PMMA) utilizadas para base de prótese, a fim de alcançar um material ideal. O nitrato de cério apresenta efeito antifúngico, principalmente contra *C. albicans*, tanto na forma planctônica quanto na forma de biofilme. Neste contexto, uma nova estratégia terapêutica para a estomatite protética, baseada não apenas no controle do biofilme, mas também da resposta imuno-inflamatória desse composto é relevante para futura prática clínica. O objetivo da pesquisa será avaliar, in vitro, a citotoxicidade e imunomodulação do nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis sobre leucócitos isolados do sangue de humano. Metodologia: A citotoxicidade será avaliada utilizando o kit LIVE/DEAD® (Molecular Probes®), segundo orientações do fabricante sobre leucócitos (mononucleares e neutrófilos) humanos isolados do sangue por centrifugação densidade-gradiente, através do método ELISA. A concentração das citocinas será determinada de acordo com a curva de regressão linear obtida pelas respectivas citocinas padrões. A resposta proliferativa dos PBMCs será avaliada pelo kit CellTrace™ CFSE dye (Invitrogen), segundo orientações do kit. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) será avaliada por método de citômetro de fluxo. Os dados obtidos tratados e aplicados testes estatísticos.

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 2.357.308

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar, ex vivo, a citotoxicidade e imunomodulação de diferentes proporções de nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas

termopolimerizáveis sobre leucócitos isolados do sangue de humano.

Objetivo Secundário:

• Avaliar o perfil de liberação de citocinas dos linfócitos humanos expostos ao nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas

termopolimerizáveis por técnica de imunoenensaio enzimático e citometria de fluxo; • Avaliar a indução de proliferação de monócitos humanos expostos ao nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis por técnica de citometria; • Avaliar espécies reativas de oxigênio ROS em neutrófilos humanos expostos ao nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas termopolimerizáveis por técnica de citometria; • Avaliar a capacidade de ativação e modulação de receptores de superfície celular em linfócitos expostos ao nitrato de cério incorporado em resinas acrílicas

termopolimerizáveis por técnica de citometria de fluxo

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os voluntários poderão apresentar hematomas subcutâneos e/ou serem submetidos a várias perfurações decorrentes da punção sanguínea necessária para coleta de sangue.

Benefícios: Utilizar o nitrato de cério no processo de confecção das próteses, como forma de tratamento alternativo para infecções por Candida Albicans na cavidade oral sem provocar citotoxicidade .

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as adequações foram realizadas conforme solicitado

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo sem pendência

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 2.357.308

Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_955363.pdf	04/10/2017 16:58:24		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta_anuencia.pdf	04/10/2017 16:46:50	Priscilla Kelly Batista da Silva Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.doc	04/10/2017 16:39:40	Priscilla Kelly Batista da Silva Leite	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	19/08/2017 07:54:38	Priscilla Kelly Batista da Silva Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_COMPLETO.doc	11/07/2017 17:23:21	Priscilla Kelly Batista da Silva Leite	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 30 de Outubro de 2017

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

7.3 Normas da Revista Acta Biomaterialia



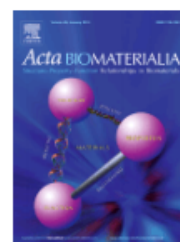
ACTA BIOMATERIALIA

Published on behalf of Acta Materialia, Inc.

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 1742-7061

DESCRIPTION

Acta Biomaterialia is an international journal that publishes peer-reviewed original research reports, review papers and communications in the broadly defined field of **biomaterials science**. The emphasis of the journal is on the relationship between **biomaterial structure** and **function** at all length scales.

The scope of *Acta Biomaterialia* includes: Hypothesis-driven design of biomaterials Biomaterial surface science linking structure to biocompatibility, including protein adsorption and cellular interactions Biomaterial mechanical characterization and modeling at all scales Molecular, statistical and other types of modeling applied to capture biomaterial behavior Interactions of biological species with defined surfaces Combinatorial approaches to biomaterial development Structural biology as it relates structure to function for biologically derived materials that have application as a medical material, or as it aids in understanding the biological response to biomaterials Methods for biomaterial characterization Processing of biomaterials to achieve specific functionality Materials development for arrayed genomic and proteomic screening

Benefits to authors

Free and automatic manuscript deposit service to meet NIH public access requirements at one year; Multiple options for data-sharing (see <http://www.materialstoday.com/materials-genome-initiative/>); Free author pdf and Sharelink share your article with your peers (see <http://www.elsevier.com/journal-authors/share-link>); And more information on our author services can be found [here](#)

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

IMPACT FACTOR

2016: 6.319 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Elsevier BIOBASE
 MEDLINE®
 Materials Science Citation Index
 EMBASE
 Science Citation Index
 Scopus
 Science Citation Index Expanded
 EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

W. R. Wagner, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

Managing Editor

V. Kucharski

Editors

M. Bohner, RMS Foundation, Bettlach, Switzerland

W. L. Murphy, University of Wisconsin at Madison, Madison, Wisconsin, USA

Coordinating Editor

C. A. Schuh, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA

Editorial Board

Kristi S. Anseth, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA

Gang Bao, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia, USA

Jake Barralet, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Angela Belcher, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA

Sangeeta Bhatia, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA

Susmita Bose, Washington State University, Pullman, Washington, USA

David G. Castner, University of Washington, Seattle, Washington, USA

Xuesi Chen, Chinese Academy of Sciences (CAS), Changchun, China

Joel Collier, Duke University, Durham, North Carolina, USA

José Manuel Delgado López, Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-UGR), Granada, Spain

Maria-Pau Ginebra, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Barcelona, Spain

Dirk W. Grijpma, University of Twente, Enschede, Netherlands

Robert Guldberg, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia, USA

Pamela Habibovic, Maastricht University, Maastricht, Netherlands

Jeffrey Hubbell, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA

Yoshito Ikada, Suzuka University, Suzuka, Japan

Klaus D. Jandt, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

Roger D. Kamm, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA

Pierre Layrolle, Université de Nantes, Nantes, France

Andreas Lendlein, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Teltow-Seehof, Germany

Kam Leong, Columbia University, Columbia, New York, USA

David C. Martin, University of Delaware, Newark, Delaware, USA

Prabhas V. Moghe, Rutgers University, Piscataway, New Jersey, USA

Yukio Nagasaki, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

Matthias Peuster, Jilin Heart Hospital, Changchun, China

Catherine Picart, Grenoble Institute of Technology, Grenoble, France

Suzie Pun, University of Washington, Seattle, Washington, USA

Rui L. Reis, University of Minho, Braga, Portugal

Erich Sackmann, Technische Universität München, Garching, Germany

Michael S. Sacks, University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA

Shelly Sakiyama-Elbert, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, USA

Christine E. Schmidt, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Patrik Schmuki, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Dror Seliktar, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

Martina Stenzel, UNSW Australia, Sydney, Australia

Samuel Stupp, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA

Maria Vallet-Regí, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Naren Vyavahare, Clemson University, Clemson, South Carolina, USA

Jun Wang, University of Science and Technology of China (USTC), Hefei, Anhui, China
Stephen Weiner, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
Cuie Wen, RMIT University, Melbourne, Victoria, Australia
Ann Wennerberg, Malmö University, Malmö, Sweden
Frank Witte, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
Chengtie Wu, Shanghai Institute of Ceramics, Shanghai, China

The Board of Governors of Acta Biomaterialia

J. Ågren

Swedish Society for Metallurgy and Materials Representative Governor

H. Ai

Chinese Society for Biomaterials, Governor

K. S. Anseth

Governor

E. Cole, Jr.

ASM Governor

A. J. Coury

Board Governor

G. Dehm

Cooperating Society Governor

A. Deschamps

French Metallurgical Society Representative Governor

G. Gray, III

Chair, Treasurer and Board Governor

C. Hansson

Executive Secretary and Cooperating Society Governor

T. Ohji

ASM Governor

G. B. Olson

ASM Governor

J. A. Schneider

TMS Board Governor

C. A. Schuh

Coordinating Editor and Governor

M. Singh

ASM Governor

G. W. Warren

TMS Governor

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Acta Biomaterialia is an international journal that publishes peer-reviewed original research reports, review papers and communications in the broadly defined field of biomaterials science. The emphasis of the journal is on the relationship between biomaterial structure and function at all length scales. The journal is committed to rapid peer-review and publication.

The scope of Acta Biomaterialia includes: Hypothesis-driven design of biomaterials Biomaterial surface science linking structure to biocompatibility, including protein adsorption and cellular interactions Biomaterial mechanical characterization and modeling at all scales Molecular, statistical and other types of modeling applied to capture biomaterial behavior Interactions of biological species with defined surfaces Combinatorial approaches to biomaterial development Structural biology as it relates structure to function for biologically derived materials that have application as a medical material, or as it aids in understanding the biological response to biomaterials Methods for biomaterial characterization Processing of biomaterials to achieve specific functionality Materials development for arrayed genomic and proteomic screening

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)*
- Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Animal Rights

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Conflict of interest

All potential conflicts of interest must be stated within the text of the manuscript, under a separate heading titled Disclosures, which should follow the Acknowledgments. This pertains to relationships with any corporation whose products or services are related to the subject matter of the article. Such relationships include, but are not limited to, employment by an industrial concern, ownership of stock, membership on a standing advisory council or committee, or being publicly associated with the company or its products. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that the figures or data have not previously been used without attribution, that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Disclosures

If any potential conflicts of interest exist, please describe them under this heading at the end of the manuscript text before the References. See definition of "Conflict of Interest" above.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/actbio/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Papers submitted to *Acta Biomaterialia*, to be acceptable, must normally be fewer than 10 printed pages in length; as a rule of thumb, a paper of 20 double-spaced typescript pages, plus a typical number of figures (8 or so), reduces to 10 printed pages. Papers that are longer than 25 double-spaced typescript pages will likely be returned to the authors with a request that they be shortened before they are considered further. Shortening, almost always, is in the author's best interest: readers read short papers.

Page numbering

Please ensure that your manuscript is paginated, as this will help both editors and reviewers to process it promptly.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Studies Involving Animals or Humans When data from animal subjects are reported, institutional approval of the protocol is required and a statement should be included in the "Methods" section of the text that indicates compliance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals or other appropriate guidelines.

For human subject data, a statement must be added to the "Methods" section indicating that an institutional review committee approved the study (with the date of approval) and that the subjects provided informed consent.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise, in a section separate from the Discussion.

Statistical methods

Careful statistical analysis must be performed and reported to support any statements regarding the existence of differences in study groups. Statistical support should underlie hypothesis testing. Error bars are required on all experimental and calculated data points. Please include a separate Statistical Methods section in the text that includes an explanation regarding how the errors, differences, and confidence levels were determined.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Discussion should be reported independently from Results. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection at the end of the Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

Title Page

Provide the following data on the title page (in the order given).

- Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations, formulae, and new trademarked product names 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 telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- 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.

Abstract

An abstract is required for all papers. The abstract should indicate the content of the paper, and should describe the main conclusions. An effective abstract is brief and normally less than 200 words. Abstracts must not exceed 250 words. References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list.

Graphical abstract

A graphical abstract (GA) is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. GAs should be submitted as a separate file in the online submission system. The graphical abstract will be displayed in online search result lists and the Contents List, but will not appear in the published online article PDF or print.

The GA visualizes one process or makes one point clear. For ease of browsing, images should have a clear start and end, preferably "reading" from top to bottom or left to right; try to reduce distracting and cluttering elements as much as possible. For examples please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/graphical-abstract>. However, specifications should be followed as in this Author Guide (see below).

Specifications: GAs should be in landscape direction with a H x W of 531 x 1328 pixels using a minimum resolution of 300 dpi. The font type should be Arial 10-16 points (smaller will not be legible). Preferred file types are TIFF, EPS, PDF or MS Office files. Please note that a graphical abstract should be one image file and should not contain multiple panels.

Keywords

Immediately after the abstract, authors should list four to five keywords that appropriately represent the contents of their manuscripts.

Abbreviations

Define abbreviations and acronyms when they first appear in the article. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

- Please assure scale bars are present and legible. In SEM images, please remove small automated scale bars and replace with new clear bars.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Error bars are required on all experimental and calculated data points with an explanation in the text as to how the errors were determined. (See Statistics)

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

All references to other papers, books, etc. must be given at the end of the paper. They should be numbered in sequence starting at the beginning of the paper. The numbers (in brackets) should appear in the text at the appropriate places.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

Archival references are preferred, but if web references must be used, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link and choosing Elsevier (numeric, with title):

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/acta-materialia>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For Zotero, please choose Elsevier (numeric, with titles):

<https://www.zotero.org/styles/elsevier-with-titles>.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. **Please include all author names. Please include article titles of all cited articles** as in the following examples.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

[dataset] [4] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

A LaTeX bibliography style and article template file can be downloaded from this page:

<https://www.elsevier.com/authors/author-schemas/latex-instructions>

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly

relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Recommended upper limit

For ease of download, the recommended upper limit for the size of a single video/animation file is 50 MB. When the size of a single file is bigger than this, some users may experience problems when downloading.

Statement of Significance

Authors are now required to submit a brief statement about the significance of their research, which should be written to a broad audience at an undergraduate level, and limited to 120 words. These statements will be peer-reviewed alongside the article and should hence be included in the initial submission. This Statement of Significance should be prepared to address (1) the novelty and significance of the work with respect to the existing literature, and (2) the scientific impact and interest to our readership.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Open data

This journal supports Open data, enabling authors to submit any raw (unprocessed) research data with their article for open access publication under the CC BY license. [More information.](#)

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available.](#) Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions.](#)

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples.](#) Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

AFTER ACCEPTANCE**Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>