

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**FEDERICO II**

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**



**SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

*Dottorato in Scienze Odontostomatologiche*

*Biocompatibilità dei materiali dentari*

**ANNO ACCADEMICO 2012/2013**

**TUTOR**

*Dott. Gianrico Spagnuolo*

**CANDIDATO**

*Dott.ssa Virginia Riviaccio*

# INDICE

|   |      |
|---|------|
| <b>1 INTRODUZIONE</b> .....   | p.1  |
| <br><b>2 MATERIALI &amp; METODI</b>   |      |
| 2.1 Prodotti chimici, reagenti e colture cellulari .....  | p.9  |
| 2.2 Citotossicità di TEGDMA disciolto in DMSO e EtOH, in presenza ed<br>assenza di NAC .....  | p.10 |
| 2.3 Determinazione HPLC delle concentrazioni di TEGDMA in DMEM .....  | p.12 |
| 2.4 Determinazione delle concentrazioni intracellulare ed extracellulare di<br>TEGDMA .....   | p.13 |
| 2.5 Concentrazioni intracellulari ed extracellulari di TEGDMA e metaboliti  | p.15 |
| 2.6 Analisi degli Addotti NAC-TEGDMA .....  | p.16 |
| 2.7 Citotossicità di adesivi .....  | p.17 |
| 2.8 Alamar Blu .....  | p.18 |
| 2.9 Misura della produzione di specie reattive dell'ossigeno .....  | p.19 |
| <br><i>Effetti dell'Etanolo e del DMSO sulla solubilità e sulla citotossicità del<br/>monomero Trietilen Glicol-Dimetacrilato</i> ..... |      |
|   | p.22 |
| <br><b>3.1 RISULTATI</b>  |      |
| 3.1.1 Effetto di TEGDMA sulla vitalità cellulare .....  | p.24 |
| 3.1.2 Effetto della TEGDMA sulla produzione di ROS .....  | p.26 |
| 3.1.3 Solubilità di TEGDMA in mezzo di coltura .....  | p.28 |
| 3.1.4 Determinazione delle concentrazioni intracellulare ed extracellulare di<br>TEGDMA .....   | p.30 |
| <br><b>4.1 DISCUSSIONE</b> .....  |      |
|   | p.32 |
| <br><b>5.1 CONCLUSIONI</b> .....  |      |
|   | p.35 |

*Detossificazione cellulare in vitro del trietilen glicol-dimetacrilato attraverso la formazione di addotti con il NAC* .....p.36

### **3.2 RISULTATI**

- 3.2.1 Effetto di TEGDMA sulla vitalità cellulare .....p.37
- 3.2.2 Determinazione della concentrazione extracellulari ed intracellulari di TEGDMA .....p.39
- 3.2.3 Identificazione acido metacrilico .....p.41
- 3.2.4 Rilevamento di Addotti NAC-TEGDMA .....p.42

**4.2 DISCUSSIONE** .....p.44

**5.2 CONCLUSIONE** .....p.47

*Biocompatibilità in vitro degli Adesivi HEMA-Free* .....p.48

### **3.3 RISULTATI**

- 3.3.1 Citotossicità di adesivi .....p.49
- 3.3.2 La proliferazione delle cellule .....p.51
- 3.3.3 ROS produzione .....p.55

**4.3 DISCUSSIONE** .....p.56

**5.3 CONCLUSIONE** .....p.61

**Bibliografia** .....p.62

# 1. INTRODUZIONE

I composti dentari in resina sono biomateriali usati per il ristoro estetico di strutture e funzioni di denti compromessi da carie, erosioni e fratture.

Di conseguenza, sono disponibili diversi materiali resinosi [1], per esempio adesivi (primer e bonding), composti resinosi fluidi e convenzionali, materiali compositi rinforzati con fibre o cementi di resina [2]. Nonostante varie modifiche nella formulazione, la composizione chimica delle resine composite comprende particelle inorganiche (quarzo, ceramica o silicio), e additivi che vengono incorporati in una miscela di una matrice di resina organica [3].

I materiali dentali a base di resine (RBM) consistono in una matrice organica polimerizzabile e un rinforzo riempitivo inorganico [4]. La matrice organica è spesso composta da diversi tipi di monomeri e tra quelli metacrilati, i più impiegati negli adesivi sono il *2-idrossietil metacrilato* (HEMA) e il *trietilenglicol-dimetacrilato* (TEGDMA) [5].

Le proprietà fisiche e chimiche, nonché la prestazione clinica dei materiali compositi, dipendono da un'adeguata polimerizzazione dei monomeri. È stato ampiamente riportato in letteratura che, dopo la polimerizzazione, i residui di monomeri metacrilici non polimerizzati vengono rilasciati nella cavità orale [6].

Attraverso esperimenti *in vitro* su colture cellulari, è stato rilevato che i monomeri delle resine interferiscono specificamente con varie funzioni cellulari vitali [7,8].

È interessante notare, che vi sono prove sperimentali le quali dimostrano che l'assorbimento, e quindi l'effettiva concentrazione intracellulare dei monomeri causano risposte cellulari adattive più di dieci volte inferiori alla concentrazione extracellulare disponibile [9]; inoltre, è stato scoperto che possono causare, *in vitro*, effetti biologici negativi [10] e determinano citotossicità nelle colture cellulari primarie ed immortalizzate [11].

HEMA non polimerizzato si presenta come un liquido solubile in acqua, etanolo e acetone. La sua idrofilicità lo rende un eccellente promotore di adesione, ed è quindi un componente comunemente usato nelle resine adesive e ampiamente utilizzato per la produzione di biomateriali non solo in odontoiatria [12]. La popolarità di questo polimero in campo medico è attribuito alla sua biocompatibilità relativamente buona [13].

Monomeri come TEGDMA o HEMA inducono citotossicità attraverso l'apoptosi in vari tipi di cellule, comprese le cellule polpa e gengiva, ed è stato riportato che essi determinano anche effetti genotossici o mutageni.

Molto probabilmente a causa di rotture nel filamento del DNA indotte monomero, le cellule attivano punti di controllo del ciclo cellulare attraverso le attività coordinate di proteine regolatrici [14,15,16].

Infine, i monomeri influenzano anche le risposte delle cellule del sistema immunitario innato.

TEGDMA ed HEMA istantaneamente down-regolano la produzione di citochine indotta da LPS nei macrofagi e inibiscono l'espressione di antigeni di superficie come CD14 ed altri marcatori di superficie essenziali per l'interazione controllata delle cellule del sistema immunitario [17,18].

In più, i livelli fisiologici rilevanti di monomeri ritardano significativamente la differenziazione odontogenica [19] e i processi di mineralizzazione in cellule derivate dalla polpa [20], comprese le cellule staminali, molto probabilmente con gravi conseguenze per meccanismi coinvolti nella riparazione fisiologica della dentina o nei processi di sviluppo dei denti permanenti umani [21]. Questi fenomeni indicano chiaramente che i monomeri usati nelle resine sono fattori di stress ambientale che necessariamente interferiscono con complessi reti di regolazione cellulare e con le vie di trasduzione del segnale.

TEGDMA induce danno mitocondriale, come indicato dal collasso del potenziale di membrana [22], porta alla deplezione di riserve di Glutathione con riduzione della vitalità cellulare [23], infine, inibisce la crescita cellulare e la sintesi dei lipidi polari [24]. L'azione intracellulare del monomero, inoltre, è stata associata all'insorgenza di apoptosi, all'attivazione dei pathways che controllano la morte cellulare e la

sopravvivenza come la proliferazione e il differenziamento attraverso l'attivazione delle proteine kinasi [25].

Invece, HEMA viene spesso aggiunto ai sistemi adesivi per la sua capacità di migliorare la stabilità del collante che tiene i vari componenti in soluzione grazie alle sue caratteristiche idrofiliche e idrofobiche [26].

Una conversione incompleta del monomero durante la polimerizzazione porta al rilascio di residui dai materiali compositi nell'ambiente orale ed è noto da tempo che le sostanze rilasciate dai materiali restaurativi dentali possono raggiungere il tessuto pulpare dopo aver diffuso attraverso la dentina [27]. HEMA causa la produzione di ROS, inibizione della crescita cellulare e arresto del ciclo cellulare [28]. Inoltre, l'esposizione a TEGDMA e HEMA induce apoptosi nelle differenti linee cellulari, questo effetto è inibito in presenza di antiossidanti come la Vitamina E e la N-acetil-L-cisteina, indicando un possibile ruolo di questi monomeri nella citotossicità indotta dai radicali [29].

Precedenti studi in vitro hanno dimostrato che questi monomeri possono causare, anche a concentrazioni non tossiche, significative alterazioni del normale processo di differenziazione dei fibroblasti pulpari in odontoblasti [30,31]. È stato riportato che la citotossicità dei monomeri potrebbe essere causata da una perdita dell'equilibrio redox cellulare pro- e antiossidante con conseguente aumento dei livelli intracellulari di ROS [32].

Le specie ROS si formano fisiologicamente a causa della riduzione incompleta dell'ossigeno molecolare determinando principalmente la produzione dell'anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ), perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), e radicali idrossilici altamente reattivi ( $HO^{\bullet}$ ) [33,34].

I livelli di ROS potrebbero superare la capacità cellulare di bilanciare l'omeostasi dell'ossigeno e causare lesioni acute e danni importanti ai componenti cellulari, incluse proteine cellulari, lipidi e DNA, portando alla morte cellulare [35,36]; inoltre studi in vitro sulla biocompatibilità dei materiali dentali riferiscono che la quantità di sostanze rilasciate da RBM potrebbe dipendere dal tipo di mezzo usato per diluirli.

L'equilibrata omeostasi intracellulare, così come il corretto funzionamento delle cellule, è strettamente controllata da un sofisticato sistema antiossidante non-enzimatico ed enzimatico [37,38]. Il glutathione (GSH), un tripeptide sintetizzato da glicina, cisteina e glutammato, è il più importante regolatore-redox non-enzimatico presente nelle cellule [39,40].

L'immediata formazione di ROS in cellule esposte alla resina ha dimostrato di essere parallelo alla deplezione del Glutathione, lo spazzino cellulare dei ROS (GSH), che protegge le strutture cellulari dai danni causati da stress ossidativo [41]. L'esaurimento del pool di GSH intracellulare può aumentare i livelli intracellulari di ROS causando la morte cellulare attraverso necrosi o apoptosi [42].



Se la produzione di ROS indotta dal monomero supera la capacità dei sistemi antiossidanti enzimatici e non enzimatici delle cellule, si ha un'alterazione delle funzioni cellulari.

Negli ultimi anni, la ricerca si è focalizzata sui meccanismi cellulari che conducono alla morte cellulare o che determinano la sopravvivenza, per trovare molecole come N-Acetilcisteina (NAC), che sono in grado di ridurre gli effetti negativi e di aumentare gli effetti vantaggiosi dei materiali dentari [43]. N-Acetilcisteina (NAC) è un agente anti-ossidante captato dalle cellule e deacetilato enzimaticamente a L-Cisteina, è un precursore della sintesi del GSH che fa aumentare le riserve di GSH intracellulare [44]. È stato dimostrato che le cellule sono protette dal danno indotto da TEGDMA in presenza di antiossidanti non enzimatici quali NAC [45], il quale riduce la citotossicità dei metacrilati per mantenere la vitalità e la funzione osteoblastica [46].

Tale molecola ha, inoltre, la capacità di esibire la sua funzione di protezione contro fenomeni negativi dovuti ai metacrilati attraverso diversi meccanismi tra cui l'attività antiossidante, l'attivazione di NFkB, la differenziazione cellulare o attraverso la formazione di un addotto di Michael [47]. Una reazione simile può verificarsi tra GSH e metacrilati portando alla deplezione di GSH, e in questo senso, è stato riportato in letteratura la formazione spontanea di un complesso tra HEMA e GSH

[48], poiché il gruppo nucleofilo di NAC facilmente lega la parte carbonilica  $\alpha$ ,  $\beta$ -insatura del monomero HEMA.

Ad oggi, i test di citotossicità sono stati considerati un utile strumento per lo screening iniziale di effetti tossici dei materiali dentali. Anche se in grado di riprodurre accuratamente le condizioni *in vivo*, gli esperimenti *in vitro* sono stati ampiamente utilizzati permettendo un'indagine dell'azione xenobiotica sulle diverse popolazioni cellulari [49].

Negli ultimi anni, grazie ai test di tossicità, si è arrivati ad avere un quadro più completo dell'azione che tali materiali resinosi svolgono. In particolare, alcuni studi *in vitro* sulla biocompatibilità dei materiali dentali riportano che la quantità di sostanze rilasciate da RBM potrebbe dipendere dal mezzo di estrazione [50]. Sono utilizzati per estrazioni sia liquidi idrofilici (soluzioni saline) che idrofobici (dimetil solfossido-DMSO), ma anche miscele (EtOH/Acqua) [51]. In realtà però, nessuno studio si è concentrato sulla possibilità che i solventi di TEGDMA potrebbero essere in grado di cambiare la concentrazione efficace di monomero intracellulare e, quindi, alterare la sua citotossicità.

La concentrazione intracellulare differisce eventualmente sulla base della quantità totale di sostanza aggiunta ad un certo volume di mezzo, e il rapporto tra la concentrazione effettiva e la concentrazione totale è generalmente sconosciuto [52].

Per tanto lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare, partendo dall'ipotesi che solventi come DMSO e EtOH possono influenzare la citotossicità cellulare e l'azione dei monomeri, come varia, a seconda della composizione della soluzione TEGDMA, sia la concentrazione attiva del TEGDMA nel terreno di coltura cellulare sia la citotossicità e i livelli di produzione di ROS. Inoltre, poiché il TEGDMA contiene la stessa identica porzione metacrilica della molecola di HEMA, abbiamo ipotizzato che anch'esso potrebbe legarsi covalentemente al NAC con la conseguente formazione di addotti NAC-TEGDMA, i quali potrebbero contribuire a mitigare gli effetti tossici del monomero stesso. Abbiamo quindi analizzato la presenza di addotti TEGDMA-NAC nei compartimenti extracellulari ed intracellulari, attraverso tecniche di elettroforesi capillare (CE-UV) ed elettroforesi capillare accoppiata a spettrometria di massa (CE-MS).

Infine, alla luce del fatto che gli adesivi dentali comunemente contengono monomeri come HEMA, tranne per alcuni nuovi adesivi three-step etch&rinse e one-step che sono liberi da HEMA, e che ogni componente di un sistema adesivo ha in qualche misura un effetto specifico sulla forza di adesione, resistenza, durata di conservazione e biocompatibilità, abbiamo voluto, come ultimo scopo del nostro studio, confrontare gli adesivi Hema-Free con un adesivo contenente il monomero, per valutarne la citotossicità, la vitalità cellulare e la produzione di ROS.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Prodotti chimici, reagenti e colture cellulari.

*Trietilenglicol-dimetacrilato*(TEGDMA); *2-idrossietilmetacrilato*(HEMA); *3(4,5dimethyliazol-2-1)-2-5-difenil tetrazolio di bromuro*(MTT); *20,70-diclorofluoresceina diacetata* (DCFH-DA); *N-acetilcisteina* (NAC); *Ioduro di Propidio* (PI); terreno di coltura cellulare; DMSO; EtOH e Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) sono stati acquistati da *Sigma Chemical* (Milano, Italia).

Per l'analisi HPLC sono stati utilizzati: Alcool metilico(CH<sub>3</sub>OH), cromatografia ad alte prestazioni in fase liquida (HPLC) e Acqua Distillata (ottenuta da un apparecchio *Power System P.Nix, Umana*, Seoul, Corea).

Sono stati utilizzati soluzione di Ammoniaca (28%, Carlo Erba, Milano, Italia), Acido Formico (98%, Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Olanda) e pastiglie di Idrossido di Sodio (Merck, Darmstadt, Germania).

Inoltre sono stati testati i seguenti adesivi: *CMFAdhesiveSystem*<sup>®</sup> (Saremco Dental AG, Svizzera), *BeautyBond* (Shofu, Giappone), *Xeno*<sup>®</sup>*V*<sup>+</sup> (Dentsply, Germania), *AdheSE*<sup>®</sup>*OneF* (Ivoclar Vivadent AG, Liechtenstein), *G-Bond*<sup>™</sup> (GC Corporation, Giappone). L'adesivo a tre fasi *Etch&Rinse OptiBond*<sup>™</sup>*FL* (Kerr Italia Srl, Italia) è stato utilizzato come controllo.

Fibroblasti di topo-3T3 (*Swiss albino mouse cell line*, Istituto Zooprofilattico, Brescia, Italia) e Cellule pulpari (HPC) sono stati coltivati a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) integrato con 2mm glutammina, 100U/ml penicillina, 100g/mL streptomina, e 10% di siero di vitello fetale (FCS).

## **2.2 Citotossicità di TEGDMA disciolto in DMSO e EtOH, in presenza ed assenza di NAC.**

Le concentrazioni citotossiche di TEGDMA sono state identificate con il Test MTT. Le cellule 3T3 sono state piastrate in una piastra da 96 pozzetti con una densità di 8000cell/pozzetto e incubate per 24h. Quindi, il mezzo è stato rimosso e il monostrato di cellule è stato esposto a diverse concentrazioni TEGDMA (0, 0.5, 1.0, 2.0mmol/L), e coltivate in presenza o assenza di 0,1% DMSO o 0,1% EtOH serviti come controlli in tutti gli esperimenti.

Contemporaneamente sono stati piastrati altri Fibroblasti-3T3, ma questa volta, una volta rimosso il mezzo, il monostrato di cellule è stato preincubato in presenza o assenza di NAC (10mmol/L) per 2h: poi, le colture cellulari sono state trattate con TEGDMA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mmol/L) per 6 e 24h in presenza o assenza di NAC (10mmol/L).

Dopo il tempo di esposizione, le cellule sono state lavate due volte con tampone fosfato salino (PBS) e il mezzo è stato sostituito con 100µL/pozzetto di una soluzione di MTT (0.5mg/ml) in tampone fosfato salino (PBS), e le cellule sono state incubate a 37°C per 1h. La soluzione di MTT è stata sostituita con 100µL/pozzetto di DMSO e agitato delicatamente per 10min.

La densità ottica in ciascun pozzetto è stato immediatamente misurata da un lettore di piastre a 540nm (Sunrise, Tecan, Svizzera), e i risultati sono stati espressi come percentuale di colture non trattate (=100%).

Ogni esperimento è stato eseguito almeno cinque volte in quattro replicati.

Inoltre, è stata utilizzata la citometria a flusso (FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) per rilevare la vitalità cellulare.

Le cellule ( $1 \times 10^5$ ) sono state piastrate in piastre (35mm) e incubate a 37°C per 24h successivamente esposte a TEGDMA (0-2mmol/L) per 6 e 24h in presenza o assenza di 10mmol/L NAC.

Dopo il trattamento, le cellule aderenti e galleggianti sono state raccolte, centrifugate e poi lavate una volta con PBS. La vitalità è stata valutata dall'assorbimento di PI (1µg/mL) e le successive analisi di citometria a flusso si sono basate su un profilo FSC-H/FL-3H.

Cellule vitali (senza colorazione) e le cellule morte (colorazione PI) sono state rilevate e quantificate come percentuale di tutta la popolazione.

I dati di almeno tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato, sono stati analizzati usando WinMDI versione 2.8 (Il Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA) (n=3).

### **2.3 Determinazione HPLC delle concentrazioni di TEGDMA in DMEM.**

L'analisi qualitativa e quantitativa è stata effettuata da con HPLC (*Sistema JASCO HPLC, 2 pompe PU-980, UV-970 UV/VIS detector e Autocampionatore AS-1555*) dotato di una colonna a fase inversa C-18 Supelco (250mm x 4,6mm ID e particelle di 5 $\mu$ m) e una Pre-colonna Supelco (20mm x 4,6mm ID, particelle di 5 $\mu$ m). La fase mobile era una miscela di H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>OH (*HPLC Grado, Sigma-Aldrich, Milano, Italia*) ed è stato applicato il seguente gradiente: 50% di CH<sub>3</sub>OH (10min), 70% di CH<sub>3</sub>OH (15min), e l'85% di CH<sub>3</sub>OH (20min). La portata era 0,7mL/min e il volume di iniezione era 100 $\mu$ L; la rivelazione agli UV è stata eseguita a 214nm. TEGDMA è stato disciolto direttamente in DMEM per ottenere soluzioni a diverse concentrazioni (0.5, 1.0, e 2.0mmol/L) o precedentemente disciolto in DMSO o EtOH e quindi aggiunto al mezzo. La concentrazione finale dei solventi in tutti i campioni (0,1%,v/v) non ha

indotto alcuna alterazione nei parametri in fase di studio, come dimostrato da studi preliminari.

Tutte le soluzioni sono state incubate a 37°C per 2h o 24h, miscelate e filtrate attraverso un filtro di 0,45µm (Whatman, Maidstone Kent, UK), e infine analizzati mediante HPLC. TEGDMA è stato identificato confrontando il suo tempo di ritenzione con quella del monomero puro nelle stesse condizioni HPLC (Figura1). Ogni analisi è stata preceduta dalla costruzione di una retta di taratura ottenuta con soluzioni di TEGDMA in CH<sub>3</sub>CN, un solvente in cui il monomero è perfettamente solubile, a concentrazioni a partire da 0,03mmol/L a 5,0mmol/L.

## **2.4 Determinazione delle concentrazioni intracellulare ed extracellulare di TEGDMA.**

I fibroblasti 3T3 sono stati incubati in fiasche da 75-mL con concentrazioni differenti di TEGDMA (0,5, 1,0 e 2,0mmol/L) o direttamente o preparati sciogliendo in precedenza il monomero in DMSO o EtOH; cellule non trattate e cellule trattate con DMSO o EtOH state usate come controllo. La concentrazione finale dei solventi era dello 0,1% in tutte le soluzioni. Le cellule sono state esposte per vari periodi di tempo (0.5h, 2h, 24h).



Dopo tale periodo di incubazione, i mezzi extracellulari sono stati rimossi, centrifugati (1500g, 5min, RT) e filtrati attraverso un filtro 0,45µm (Whatman, Maidstone Kent, Regno Unito; campioni extracellulari).

Il monostrato cellulare è stato lavato con soluzione fisiologica al fine di rimuovere TEGDMA dalla superficie dello strato cellulare, è stato aggiunto eptano (2mL) e agitato per 2min a 25°C (campioni di cellule superficiali). Per ottenere il fluido intracellulare gli strati di cellule 3T3 sono stati lisati mediante congelamento a -80°C. I lisati cellulari sono stati centrifugati (20.000g, 15min, 4°C) e i surnatanti raccolti (campioni intracellulari).

Tutti campioni (extracellulare, superficie cellulare e intracellulare) sono stati analizzati utilizzando la tecnica HPLC come precedentemente descritto (sezione " HPLC determinazione della effettiva Concentrazioni TEGDMA in DMEM").

La quantificazione HPLC di TEGDMA è stata eseguita anche per verificare possibili interazioni tra il monomero e sostanze presenti all'interno delle cellule.

## **2.5 Concentrazioni intracellulari ed extracellulari di TEGDMA e metaboliti.**

Al fine di determinare l'effetto di NAC sulla concentrazione intracellulare ed extracellulare di TEGDMA, i fibroblasti 3T3 ( $1.0 \times 10^6$ ) sono stati seminati in fiasche da  $25\text{cm}^2$ , pre-incubate con NAC (10mmol/L) per 2h, e poi trattati con TEGDMA (0, 0.5, 1,0, e 2,0mmol/L) per diversi periodi tempo (10min, 1h, 2h e 24h) in presenza o assenza di NAC (10mmol/L).

Il citosol dai fibroblasti 3T3 è stato ottenuto dopo lisi cellulare mediante congelamento ( $-80^\circ\text{C}$ ) e scongelamento. I lisati cellulari sono stati centrifugati ( $20.000 \times g$ , 15min,  $4^\circ\text{C}$ ), e i surnatanti sono stati raccolti. I mezzi extracellulari sono stati centrifugati e filtrati attraverso un filtro da  $0,45 \mu\text{m}$  (Whatman, MaidstoneKent, UK).

Entrambi i campioni sono stati quindi analizzati utilizzando un sistema di HPLC JASCO (2 PU-980 pompe, UV-970 UV / VIS rivelatore e AS-1555 campionatore, JASCO Analytical Instruments, Maria Corte Easton, Maryland USA). Le analisi sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 220nm con una colonna C-18 Supelco a fase inversa ( $150 \times 4.7\text{mm}$ ,  $5\mu\text{m}$ ) utilizzando un gradiente di eluizione di acqua (A) e metanolo (B) da 35% al 75% di B (30 min),  $0.7 \text{ mL/min}$  di flusso,  $50\mu\text{l}$  di volume iniettato. Ogni analisi è stata effettuata cinque volte ( $n = 5$ ).

TEGDMA stato identificato confrontando il suo tempo di ritenzione con quella del monomero puro nelle stesse condizioni di HPLC. Per valutare la concentrazione del monomero ciascuna analisi è stata preceduta dalla costruzione di una linea di taratura ottenuta con soluzioni di TEGDMA in Aceto Nitrile (CH<sub>3</sub>CN) a concentrazioni a partire da 0,03mmol/L a 5,0mmol/L. Per verificare se la rilevabilità e l'intensità del segnale del monomero sono uguali nell'analisi di una miscela complessa come DMEM o lisati cellulari, sono stati diluiti sette campioni di DMEM e sette lisati cellulari con TEGDMA alle concentrazioni tra 0,03mmol/L e 5,0mmol/L. Al fine di rilevare i metaboliti cellulari, i fibroblasti 3T3 sono stati trattati con 1,0mmol/L di TEGDMA per diversi periodi di tempo (10min, 1h, 2h, e 24h), è stato raccolto il citosol come descritto, e analizzati mediante tecnica CE-UV.

## **2.6 Analisi degli Addotti NAC-TEGDMA.**

Una soluzione di NAC in H<sub>2</sub>O (4mmol/L, 3mL) è stato miscelato con Acetato di Ammonio 0,1mmol/L per raggiungere pH7.

Successivamente la soluzione è stata incubata a 37°C con TEGDMA puro corrispondente a una concentrazione finale di 0,5mmol/L.

Questa miscela di reazione è stata immediatamente e dopo 24h analizzata mediante HPLC (come descritto sopra), CE-UV e CE-MS, e sono stati inclusi anche soluzioni contenenti NAC o TEGDMA separatamente. Ogni analisi è stata eseguita cinque volte (n=5).

## **2.7 Citotossicità di adesivi.**

La citotossicità di adesivi è stata valutata mediante saggio MTT. HPC sono state piastrate in una piastra da 96 pozzetti con una densità di 8000cellule/pozzetto per 24h a 37°C.

Poi, il mezzo è stato rimosso e i monostrati di cellule sono state esposte a varie concentrazioni di sei adesivi (0-0,75mg/ml) per 24 ore.

Successivamente, il mezzo è stato sostituito da 100µL/well di soluzione di MTT (0,5mg/ml) in soluzione PBS, e le cellule sono state incubate a 37°C per 1h. La soluzione di MTT è stata sostituita da 100µL/well di DMSO, e agitato delicatamente per 10min. La densità ottica di ciascun pozzetto è stato immediatamente misurata con un lettore di piastre a 540nm (Alba, TECAN, Svizzera). Esperimento è stato eseguito quattro volte in quadruplicato.

I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule non trattate e analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA (p <0,05).

## **2.8 Alamar blu del saggio.**

La vitalità cellulare e la proliferazione state valutate usando il test Alamar blu. Questo si basa su una reazione redox che avviene nei mitocondri delle cellule. Il prodotto colorato viene trasportato fuori dalla cellula e può essere misurato spettrofotometricamente.

L'esperimento è stato condotto in due condizioni differenti, con differenti concentrazioni. In una prima condizione, le cellule HPC sono state poste in piastre da 24 pozzetti con una densità di 90.000cells/well per 24h a 37°C ed esposte a concentrazioni di 0; 0.05; 0.1; 0.2mg/ml per 24h, 72h, 1 settimana e 2 settimane.

Per ciascun pozzetto è stato aggiunto 1ml di mezzo DMEM senza rosso fenolo (HyClone, UK) contenente 10 vol.% Alamar blue (ABD Serotec Ltd., UK), seguito da incubazione in per 4h a 37°C. Successivamente un'aliquota di 200µl della soluzione è stata rimossa dai pozzetti e trasferita in una piastra a 96 pozzetti. Dopo la prova, le cellule sono state stimolate nuovamente alla stessa concentrazione e incubare fino alla prossima analisi.

In una seconda condizione, le cellule HPC sono stati poste in piastre da 24 pozzetti con una densità di 90.000cells/well per 24h a 37°C e quindi sono state esposte a concentrazioni di 0, 0.2, 0.1, 0.4, 0.6, 0.8mg/ml per 24h, 72 ore, 1 settimana e 2 settimane.

Per ciascun pozzetto è stato aggiunto 1ml di mezzo (DMEM) senza rosso fenolo (HyClone, UK) contenente 10vol.% Alamar Blue (ABD Serotec Ltd., UK), seguito da incubazione per 4h a 37°C. Successivamente è stata rimossa dai pozzetti un'aliquota di 200µl della soluzione e trasferito in una piastra a 96 pozzetti. Dopo la prova, le cellule non sono state ri-stimate con adesivi, ma è stato aggiunto solo il mezzo di crescita. La densità ottica è stata immediatamente misurata con uno spettrofotometro Alba (Tecan, Männedorf, Svizzera), alle lunghezze d'onda di 540 e 600nm.

Il numero di cellule vitali è correlata con il livello di riduzione del colorante ed è espresso come percentuale di riduzione Alamar Blue (% riduzione AB). Ogni esperimento è stato eseguito tre volte in triplice copia.

## **2.9 Misura della produzione di specie reattive dell'ossigeno.**

La generazione di ROS è stata misurata utilizzando DCFH-DA, un sonda fluorescente ossido-sensibile.

L'attività intracellulare dell'esterasi risulta nella formazione di DCFH, un composto che emette fluorescenza quando viene ossidato a DCF-DA.

I fibroblasti 3T3 ( $1 \times 10^5$  cellule) sono stati incubati con concentrazioni diverse di TEGDMA (0, 0,5, 1,0, 2,0mmol/L) per 0.5h, 1h, 2h, e 24h a 37°C, e colture cellulari non trattate e cellule trattate con DMSO 0,1% o

0,1% Etanolo sono state usate come controllo, mentre le HPC ( $1 \times 10^5$  cellule) sono state incubate con due diverse concentrazioni di adesivi (0,2-0,8 mg/ml) per 1h a 37°C.

Poi, alle cellule sono stati aggiunti 10mmol/L di DCFH-DA per 30min a 37°C, successivamente staccate con tripsina/EDTA, lavate, risospese in PBS, e immediatamente analizzate al citofluorimetro. È stato usato il citofluorimetro FACScan (*BD Biosciences, San Jose, CA*) per misurare, attraverso l'intensità della loro fluorescenza (FL-1, 530nm), la generazione di ROS nelle cellule, la quale è stata calcolata come intensità media di fluorescenza ottenuta con WinMDI 2,8.

Ogni esperimento è stato eseguito almeno quattro volte in duplicato e i dati sono stati normalizzati rispetto a colture di controllo non trattate (1.0), e le differenze tra i valori mediani sono stati analizzati statisticamente utilizzando il Mann-Whitney U test per confronti a coppie tra i gruppi a livello di significatività 0.05.

## **Analisi statistica.**

I dati di tutti gli esperimenti sono stati sintetizzati come media  $\pm$  deviazione standard (SD) e le differenze tra le medie sono state analizzate mediante un'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Tukey per confronti multipli. Il livello di significatività è stato fissato a  $p < 0.05$



## **Effetti dell'Etanolo e del DMSO sulla solubilità e sulla citotossicità del monomero Trietilen Glicol-Dimetacrilato**

TEGDMA di solito è disciolto in DMSO o EtOH prima che venga aggiunto al mezzo di coltura.

DMSO ha un dominio altamente polare e due gruppi non polari, il che lo rende solubile sia in soluzione acquosa che e organica. DMSO può indurre pori acquosi nel doppio strato dipalmitoil-fosfatidilcolinico e questo è un possibile pathway per il miglioramento della penetrazione di molecole attive attraverso le membrane lipidiche.

L'Etanolo è comunemente usato come il solvente preferito, nonché impiegato come co-solvente con acqua durante gli esperimenti di permeazione in vitro. EtOH può infatti alterare le proprietà di permeabilità della membrana plasmatica.

Finora, nessuno studio si è concentrato sulla possibilità che i solventi di TEGDMA possono essere in grado di cambiare le effettive concentrazioni intracellulare del monomero e, quindi, la sua citotossicità.

Tuttavia, la tossicità in vitro potrebbe non solo essere correlata alla sensibilità delle cellule esaminate e all'attività delle molecole testate, ma anche alla loro disponibilità nei sistemi dei test in vitro.

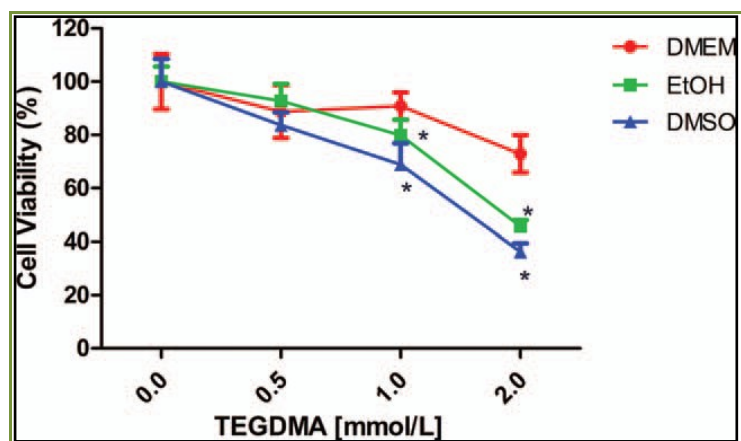
Pertanto, in questo studio, è stata valutata l'ipotesi che i solventi di TEGDMA, come DMSO e EtOH, possano influenzare la potenza citotossica del monomero.

A tale scopo, è stata valutata l'attiva concentrazione di TEGDMA nel terreno di coltura cellulare, e sono stati analizzati eventuali cambiamenti nella citotossicità e nei livelli di ROS, a seconda della composizione della soluzione TEGDMA.

## **3.1 RISULTATI**

### **3.1.1 Effetto di TEGDMA sulla vitalità cellulare.**

È stata testata la citotossicità di TEGDMA in tutte le condizioni sperimentali utilizzate per sciogliere il monomero (**Fig.1**). TEGDMA (1,0mmol/L) disciolto in DMSO o EtOH induce una significativa riduzione della vitalità cellulare rispetto a colture di controllo. Una differenza significativa di citotossicità è stata trovata con 1,0mmol/L di TEGDMA disciolto in DMSO (**Fig.1**). Tuttavia, nessuna differenza è stata rilevata quando il monomero è stato disciolto in EtOH (**Fig.1**). TEGDMA disciolto in DMSO o EtOH, ad una concentrazione di 2,0mmol/L, causa una significativa diminuzione della vitalità cellulare rispetto alle colture in cui è stato direttamente disciolto in mezzo (**Fig.1**). DMSO, la soluzione di EtOH (0,1%), e 0,5 mmol/L di TEGDMA non mostrano alcun significativo effetto sulla vitalità cellulare (dati non mostrati).



**Fig.1 Effetti citotossici di TEGDMA nei fibroblasti-3T3 dopo 24h di incubazione a varie concentrazioni di TEGDMA.**

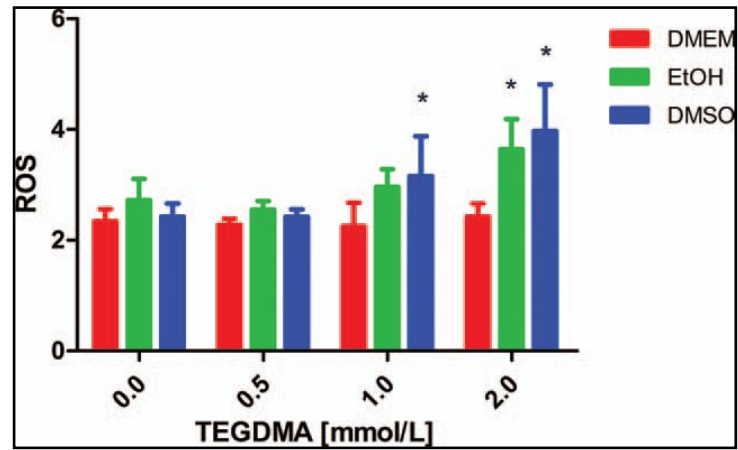
Le cellule BALB-3T3 esposte mostrano differenze nell'attività della deidrogenasi mitocondriale rispetto al colture cellulari usate come controllo. Ogni valore rappresenta la media $\pm$ SEM per quattro esperimenti indipendenti. \* (P <0,05) indica una significativa differenza per cellule non trattate.

### **3.1.2 Effetto della TEGDMA sulla produzione di ROS.**

Non sono state rilevate significative differenze di induzione dei ROS tra le soluzioni di TEGDMA dopo 0.5h, 24h (dati non mostrati). Dopo 1h, non era evidente un aumento significativo dei livelli di ROS nelle cellule 3T3 quando 1,0 e 2,0mmol/L di TEGDMA erano direttamente disciolti in DMEM.

Non si è mostrato statisticamente significativo il leggero aumento della produzione di ROS con 1,0mmol/L di TEGDMA disciolto in EtOH, mentre una differenza significativa è stato rilevato quando il monomero è stato disciolto in DMSO (**Fig.2**).

Inoltre, 2,0mmol/L TEGDMA disciolto in DMSO o EtOH causa una significativa induzione di ROS rispetto ai controlli non trattati o al TEGDMA puro disciolto nel mezzo (**Fig.2**). L'aumento massimo dei livelli di ROS è stata indotta da 2,0mmol/L di TEGDMA disciolto in DMSO (**Fig.2**). Dopo 2h, l'induzione di livelli di ROS era simile ma minore rispetto all'aumento rilevato dopo 1h (dati non mostrati). I solventi, 0,1%DMSO e 0,1%EtOH, da soli non hanno causato un aumento significativo dei livelli di ROS (dati non mostrati).



**Fig.2 L'induzione di produzione di ROS.**

Le colture cellulari sono state esposte a diverse soluzioni di TEGDMA per 1h. Sono stati determinati i livelli di ROS con DCFH-DA e la produzione di ROS è stata misurata come intensità media della fluorescenza. I risultati sono espressi come media±SEM ottenuta da almeno quattro esperimenti indipendenti in duplicato. \*(p<0,05) indica una differenza significativa per cellule non trattate.

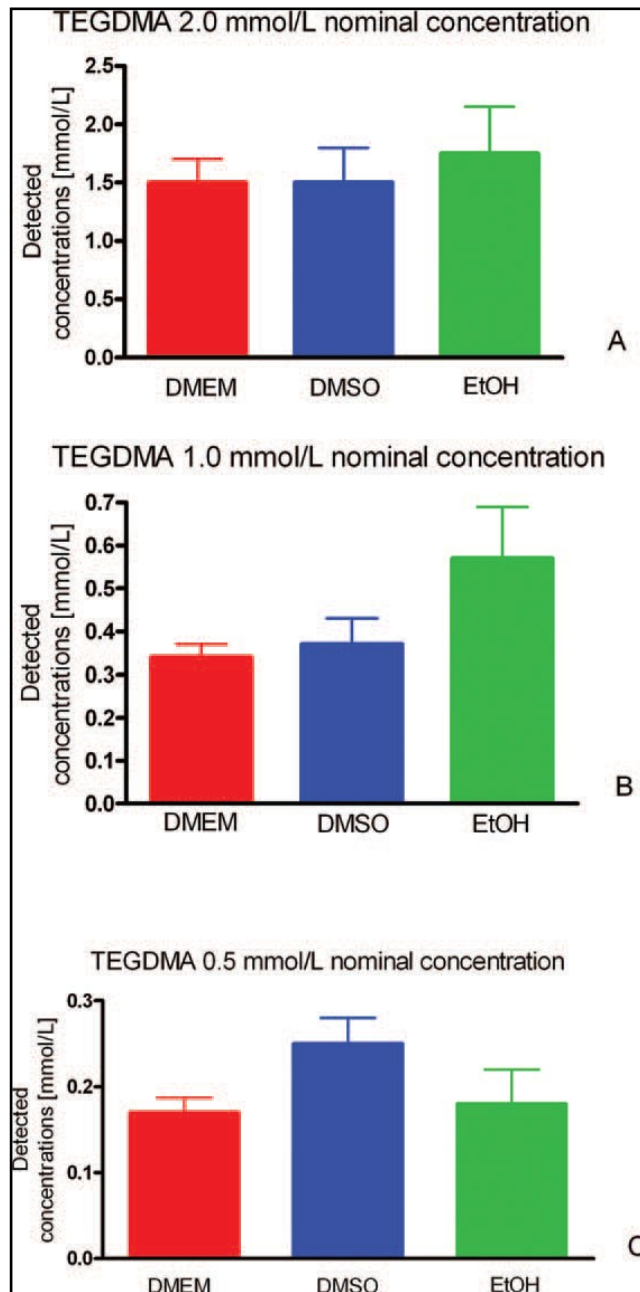
### 3.1.3 Solubilità di TEGDMA in mezzo di coltura.

Una soluzione preparata con 2mmol/L di TEGDMA in EtOH è stata rilevata come 1,7mmol/L, corrispondente ad una diminuzione del 15%, che non è stata significativa. Quando 2mmol/L di TEGDMA puro è stato disciolto nel mezzo di coltura cellulare o in DMSO, è stata misurata una concentrazione di 1,5mmol/L secondo la linea standard di calibrazione del monomero (Fig.3A). 1,0mmol/L (Fig.3B) o 0,5mmol/L di soluzioni TEGDMA (Fig.3C) sono state invece rilevate in concentrazioni significativamente inferiori (tra il 30% e il 60%, Tab.1) al previsto.

Risultati simili sono stati ottenuti analizzando le soluzioni dopo 24h (dati non mostrati).

**TABELLA I.** Differenze statistiche (ANOVA Followed by Tukey'sTest) delle concentrazioni di TEGDMA in DMEM (in presenza o assenza di solventi) vs. TEGDMA in CH3CN (Soluzione Standard)

| <i>Tukey's multiple comparison test</i> | <i>p Value</i> |
|---|----------------|
| 2.0 mM TEGDMA in DMEM vs. CH3CN         | NS             |
| 2.0 mM TEGDMA in DMSO vs. CH3CN         | NS             |
| 2.0 mM TEGDMA in ETOH vs. CH3CN         | NS             |
| 1.0 mM TEGDMA in DMEM vs. CH3CN         | $p < 0.05$     |
| 1.0 mM TEGDMA in DMSO vs. CH3CN         | $p < 0.05$     |
| 1.0 mM TEGDMA in ETOH vs. CH3CN         | $p < 0.05$     |
| 0.5 mM TEGDMA in DMEM vs. CH3CN         | $p < 0.01$     |
| 0.5 mM TEGDMA in DMSO vs. CH3CN         | $p < 0.05$     |
| 0.5 mM TEGDMA in ETOH vs. CH3CN         | $p < 0.01$     |



**Fig.3 Solubilità di TEGDMA**

I livelli di ottenibili in DMEM in presenza e assenza di EtOH o DMSO dopo 2h di incubazione TEGDMA.



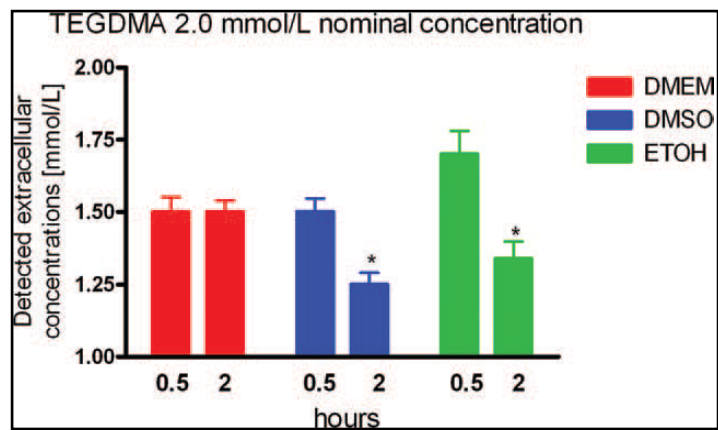
### **3.1.4 Determinazione delle concentrazioni intracellulare ed extracellulare di TEGDMA.**

TEGDMA è stato aggiunto alle cellule puro o disciolto in DMSO o EtOH alle concentrazioni 0.5, 1.0, e 2.0mmol/L. Poi, le effettive concentrazioni intracellulare, extracellulari e campioni sulle superfici cellulari, sono state determinate mediante analisi HPLC dopo 0.5h, 2h, o 24h di incubazione. La concentrazione extracellulare di TEGDMA rilevata dipendeva dalla quantità del monomero di partenza e la presenza del solvente.

La concentrazione di TEGDMA (0,5mmol/L e 1.0mmol/L) è diminuita nel corso del tempo, senza significative influenze del veicolo (dati non mostrati). Al contrario, per 2,0mmol/L di TEGDMA, è stata osservata una diminuzione di quest'ultimo, in presenza di EtOH o DMSO, infatti, dopo 2h di incubazione è stata rilevata una riduzione di TEGDMA causato da EtOH(20%) e da DMSO(15%).

Al contrario, in assenza di veicoli, la concentrazione di TEGDMA dopo lo stesso tempo di incubazione, è rimasta invariata (Fig.4). Dopo 24h, i livelli di TEGDMA nel terreno di coltura erano uguali in tutte le condizioni sperimentali (dati non mostrati). In tutte le condizioni testate, sono state rilevate solo tracce di TEGDMA in campioni intracellulari e di superficie cellulare, indipendentemente dalla presenza dei veicoli (dati non mostrati).

Inoltre, l'analisi HPLC non ha mostrato alcuna interazione tra TEGDMA e le sostanze presenti all'interno delle cellule (dati non illustrato).



**Fig.4** Concentrazioni extracellulari TEGDMA dopo 0,5 h e 2 h di incubazione. Il mezzo contenente TEGDMA (2mmol/L, puro o disciolto in precedenza veicolo) è stato aggiunto alle cellule. \*( $p < 0,05$ ) indica differenze significative tra le concentrazioni di monomero di ciascuna soluzione misurata dopo 0,5 h, 2 h di incubazione.

## 4.1 DISCUSSIONE

Gli effetti citotossici del TEGDMA sono state ampiamente dimostrati utilizzando varie tecniche e linee cellulari differenti. I metodi comunemente utilizzati si basano sulla quantificazione delle attività enzimatiche, rilevazione delle variazioni dell'integrità di membrana, misurazioni dei tassi di proliferazione, o determinazione della sintesi di macromolecole cellulari [53].

Tuttavia, nessuno studio si è concentrato sulla possibile influenza dei solventi utilizzati per solubilizzare TEGDMA, come DMSO o EtOH, sull'efficace concentrazione finale del monomero e sulle relative risposte cellulari. Per questo motivo, nel presente studio sono state quantificate le concentrazioni attive di TEGDMA raggiunte nei comuni mezzi di coltura cellulare nelle condizioni sperimentali *in vitro*. Inoltre, stati ulteriormente valutati eventuali cambiamenti nella potenza citotossica del TEGDMA in base ai solventi impiegati.

Le differenze di concentrazione del TEGDMA rilevate nel mezzo di coltura, sia in presenza che in assenza di solventi, sono state inattese. Quando la soluzione viene preparata con concentrazioni decrescenti di TEGDMA (da 2,0mmol/L a 1,0 e 0,5mmol/L), la diminuzione nell'effettiva concentrazione misurata diventa più definitiva.

Questi risultati potrebbero essere spiegati considerando una possibile interazione tra TEGDMA e i gruppi tiolici di proteine e cisteine [54] contenuti nel supporto: infatti poiché tale reazione consuma sempre la stessa quantità di monomero, la diminuzione di quest'ultimo è più evidente quando la soluzione è meno concentrata.

Tale fenomeno è interessante e importante per valutare le informazioni acquisite dai test in vitro [55].

Per determinare la citotossicità e l'aumento dei livelli di ROS è stato utilizzato il mezzo con tre differenti concentrazioni di monomero (0,5mmol/L, 1,0mmol/L, e 2,0mmol/L), in presenza o in assenza di DMSO o EtOH. È interessante notare che i risultati ottenuti hanno rivelato che la citotossicità, così come la produzione di ROS, era aumentata quando TEGDMA era disciolto in DMSO o EtOH prima dell'aggiunta al mezzo.

Così, è possibile presumere che tali solventi agendo come veicoli sono in grado di facilitare l'assorbimento del monomero da parte delle cellule [56].

Al fine di verificare questa ipotesi, le cellule sono state incubate con TEGDMA disciolto come sopra riportato e le effettive concentrazioni monomeriche sono state misurate, sia all'interno che all'esterno delle cellule, dopo diversi tempi di incubazione (0.5h, 2h, e 24h).

Un periodo di 0.5h, infatti, permette la completa dissoluzione del TEGDMA in DMEM, mentre dopo un'incubazione di 2h è stato ancora

possibile rilevare TEGDMA non metabolizzato all'interno delle cellule in assenza di citotossicità (Dati non mostrati).

Inoltre, il livello massimo di ROS è stato rilevato entro le 2h di incubazione, tenendo conto del breve periodo in cui il monomero determina la produzione di ROS [57].

Infine, le concentrazioni di TEGDMA sono state valutate nel mezzo e in campioni intracellulari dopo 24h. È molto interessante notare che la presenza di solventi altera la cinetica di assorbimento di TEGDMA 2mmol/L, ma non il suo valore totale all'interno delle cellule, infatti dopo 2h la concentrazione del monomero nel mezzo è inferiore in presenza di solventi, ma tale differenza scompariva dopo 24h.

Questa scoperta consente di razionalizzare l'aumento della produzione di ROS e, di conseguenza, la tossicità indotta da TEGDMA sciolto in EtOH o DMSO. Tuttavia l'effetto cinetico è assente a basse concentrazioni di TEGDMA (1,0mmol/L) e l'aumento osservato di citotossicità, indotta dal monomero sciolto in precedenza in DMSO, potrebbe essere attribuita ad un effetto sinergico [58]. All'interno delle cellule, sono state rilevate solo tracce di TEGDMA, probabilmente perché quest'ultimo è stato rapidamente metabolizzato come già riportato per un'altra popolazione cellulare [59].

Xenobiotici come TEGDMA e HEMA, infatti, sono metabolizzati principalmente attraverso due percorsi: possono reagire con GSH a formare addotti [60] e, dopo la conversione in acido mercapturico, vengono

consegnati al rene per l'escrezione o sono coinvolti in ulteriori metabolismi. Alternativamente, i metacrilati possono essere enzimaticamente trasformati da esterasi non specifiche in acido metacrilico, un substrato fisiologico della via epossidica, infine convertito in CO<sub>2</sub> attraverso il Ciclo di Krebs [61].

Al contrario di HEMA, l'idrolisi di TEGDMA porta alla formazione di due molecole di acido metacrilico, questo fatto potrebbe aiutare a spiegare la tossicità più forte di TEGDMA rispetto ad HEMA, poiché i composti epossidici sono molto tossici. Il diverso rate metabolico tra HEMA e TEGDMA nelle linee cellulari Swiss-3T3 può inoltre essere spiegato attraverso la maggiore lipofilia di quest'ultimo componente [62].

## 5.1 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano che la presenza di solventi non altera sostanzialmente la solubilità TEGDMA, ma facilita l'ingresso del monomero nelle cellule, aiutando a spiegare l'aumento di tossicità del monomero che è stato osservato. Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che i diversi solventi solitamente usati per sciogliere TEGDMA potrebbero incidere sulle risposte cellulari e, a loro volta, sulla citotossicità resina monomero.

## **Detossificazione cellulare in vitro del trietilen glicol- dimetacrilato attraverso la formazione di addotti con il NAC**

NAC è un antiossidante noto per essere lo spazzino dei ROS, ma NAC può agire come un surrogato per la Cisteina dopo deacetilazione per facilitare la produzione di GSH. Sebbene sia noto che la morte cellulare, indotta da monomeri presenti negli adesivi, sia significativamente inibita dagli effetti protettivi di NAC, e sebbene siano noti i diversi meccanismi d'azione della molecola di N-Acetilcisteina contro i danni cellulari, finora non ci sono prove sul diretto meccanismo di disintossicazione dal monomero da parte di NAC. Qui, abbiamo ipotizzato che NAC potrebbe ridurre la citotossicità di TEGDMA attraverso la diretta formazione di addotti NAC-TEGDMA.

## **3. 2 RISULTATI**

### **3.2.1 Effetto di TEGDMA sulla vitalità cellulare.**

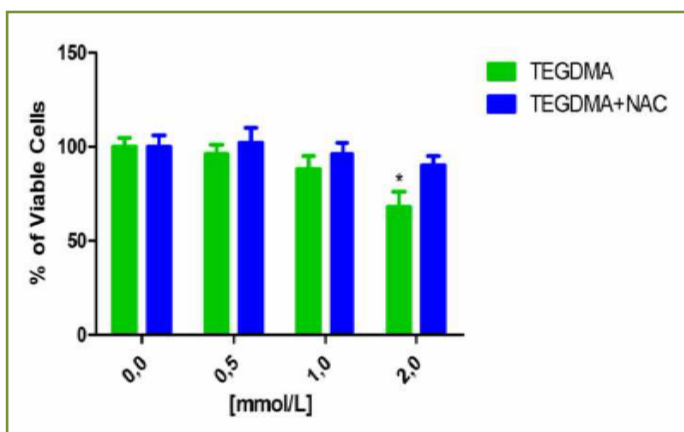
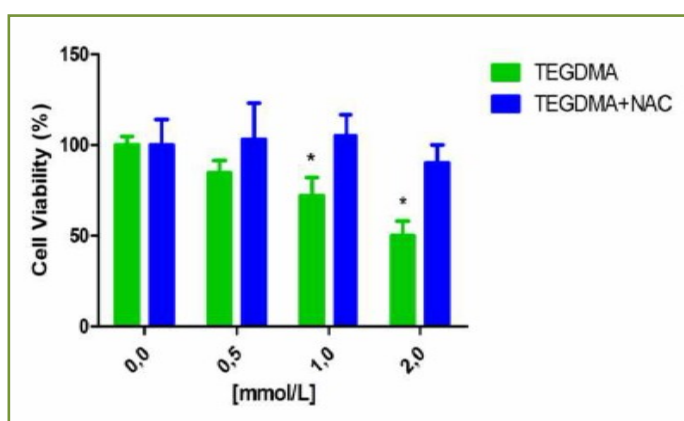
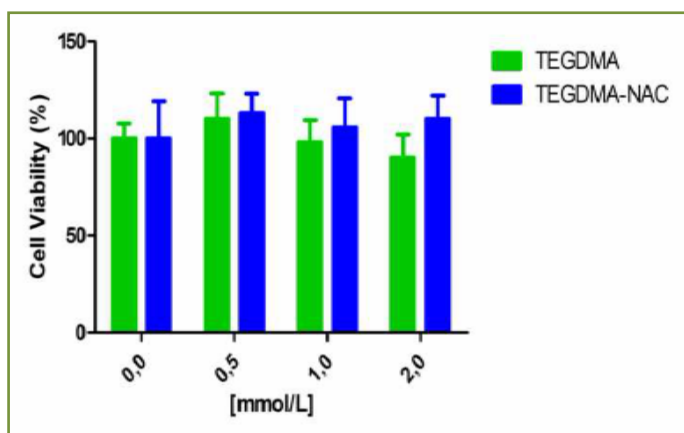
Il test MTT non ha mostrato alcuna riduzione significativa della vitalità delle cellule, quando incubate con TEGDMA per un periodo inferiore a 6h (**Fig.1A**). Dopo 24h, TEGDMA si ha invece una ridotta vitalità cellulare in modo dose-dipendente (**Fig.1B**).

La vitalità cellulare diminuisce del 70% dopo l'esposizione a 1mmol/L di TEGDMA, ed è ulteriormente ridotta (40%) in presenza di 2mmol/L di TEGDMA (**Fig.1B**).

Inoltre, l'analisi della vitalità cellulare mediante citometria di flusso mostra che dopo 6h non si hanno effetti statisticamente significativi (dati non mostrati), mentre 24h di incubazione del monomero determina una riduzione dose-dipendente della popolazione di cellule vitali (**Fig.1C**).

Tuttavia, entrambe le tecniche utilizzate hanno mostrato che la citotossicità di TEGDMA era significativamente inibita in presenza di 10mmol/L di NAC (**Fig. 1**).





**Fig.1. Effetti di TEGDMA e NAC sulla vitalità cellulare.**

Le cellule sono state trattate con 0-2mmol/L di TEGDMA in presenza o assenza di 10mmol/L di NAC.

L'attività della Deidrogenasi Mitocondriale (MTT Test) è stato quantificato dopo 6h (A) e 24h (B) in presenza e assenza di NAC (C) Dopo 24h la vitalità della popolazione cellulare è stata quantificata anche attraverso la citofluorimetria.

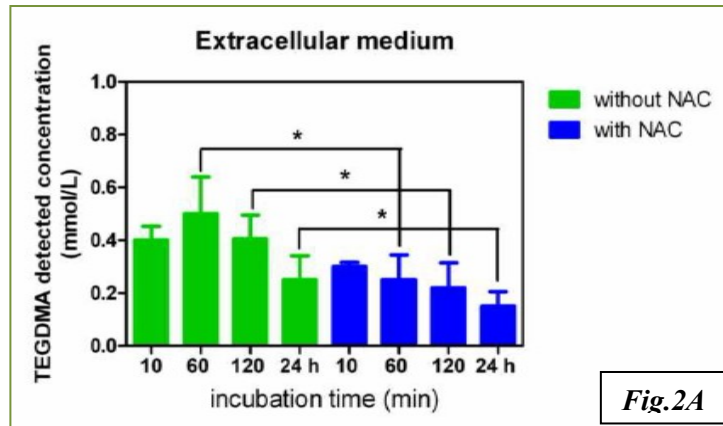
### **3.2.2 Determinazione della concentrazione extracellulari ed intracellulari di TEGDMA.**

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la rilevabilità del monomero non è influenzata dalla complessità delle miscele (dati non mostrati). La variazione nel tempo - nel mezzo extracellulare - di 0,5mmol/L di TEGDMA in presenza o assenza di NAC è mostrato in **Fig.2A**.

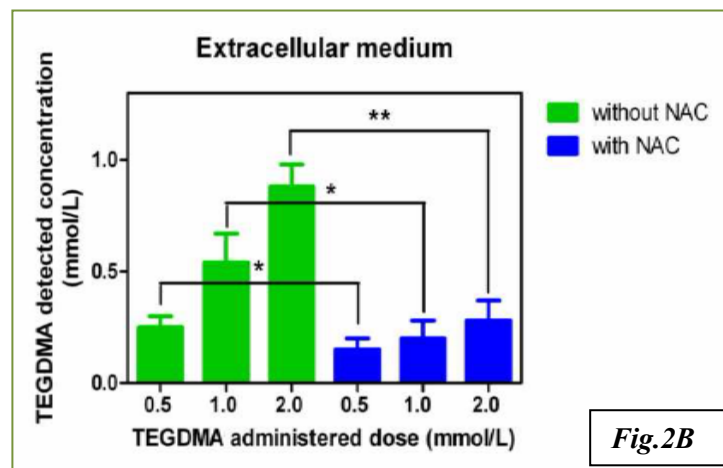
Questa concentrazione di TEGDMA era stabile durante i primi 120min in assenza di NAC, ma diminuiva al 50% dopo un periodo di incubazione di 24h. In contrasto, NAC induce una diminuzione significativa della concentrazione extracellulare di TEGDMA già dopo un periodo di incubazione di 1h, e risultati simili erano ottenuti utilizzando 1.0 o 2.0mmol/L di TEGDMA.

Dopo un periodo di 24h di incubazione in presenza di NAC, 0.5, 1.0 e 2.0mmol/L di TEGDMA è stato ridotto del 40%, 60% e 70%, rispettivamente (**Fig.2B**).

All'interno delle cellule, 2mmol/L di TEGDMA raggiunge concentrazioni molto basse (solo tracce), invariate rispetto al tempo sia in presenza che in assenza di NAC (**Fig.3**).



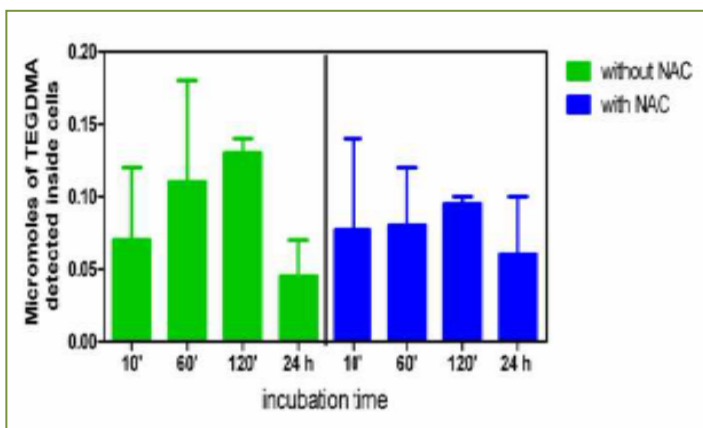
**Fig.2A**



**Fig.2B**

**Fig.2. Concentrazione extracellulare di TEGDMA.**

L'analisi HPLC ha mostrato che, nel tempo, il livello di concentrazione di 0,5mmol/L di TEGDMA in DMEM è quasi stabile durante i primi 120min, mentre diminuisce di circa il 50% dopo 24h (A). Il NAC riduce la concentrazione extracellulare del monomero (A). L'effetto di NAC sulla concentrazione extracellulare di TEGDMA (B) viene valutato (dopo 24h) utilizzando tre diversi livelli di dose somministrata. Le barre rappresentano le medie±SD di esperimenti ripetuti (n = 5). \*p<0,05, \*\*p<0,01 indica differenze significative tra le cellule incubate con monomeri in presenza o assenza di NAC.



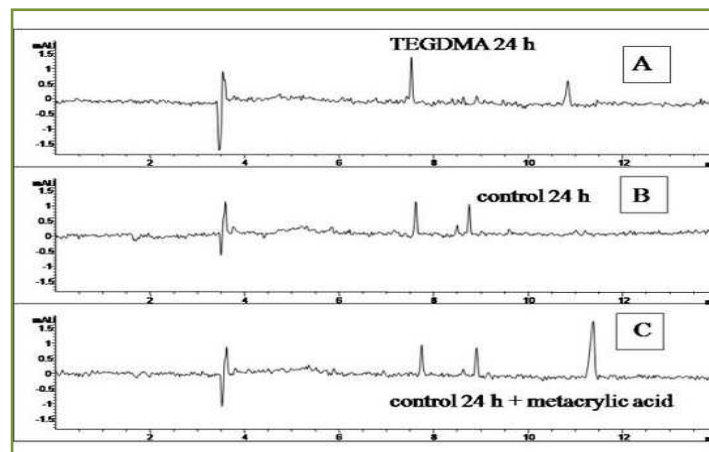
**Fig.3 Concentrazione intracellulare di TEGDMA.**

Analisi HPLC dei livelli intracellulari di TEGDMA in presenza e assenza di NAC (10mmol/L).

La concentrazione di TEGDMA è stata quantificata usando curve di calibrazione ottenute con soluzioni standard prima di ogni analisi. Le barre rappresentano le medie±SD di esperimenti ripetuti (n = 5).

### 3.2.3 Identificazione acido metacrilico.

Un segnale, attribuito al metabolita di acido metacrilico TEGDMA, era presente nell'elettroferogramma CE-UV di lisati cellulari dopo incubazione con TEGDMA (Fig.4). Dopo 24h di incubazione, l'elettroferogramma ha mostrato la presenza di un picco con un tempo di migrazione di 11min (Fig.4A). Questo picco era assente nel profilo del campione di controllo (Fig.4B) e sommato con il picco di acido metacrilico (Fig.4C) aggiunto alla matrice stessa.



**Fig 4** Identificazione degli addotti con CE-UV.

L'analisi CE-UV dei lisati cellulari ottenuti dopo incubazione in presenza di (A) e in assenza (B) di TEGDMA. Dopo 24h l'elettroferogramma mostra (pannello A) la presenza di un picco con un tempo di migrazione di 11min, assente nel campione di controllo (pannello B) e presente dopo l'aggiunta di acido metacrilico (pannello C)

### 3.2.4 Rilevamento di Addotti NAC-TEGDMA.

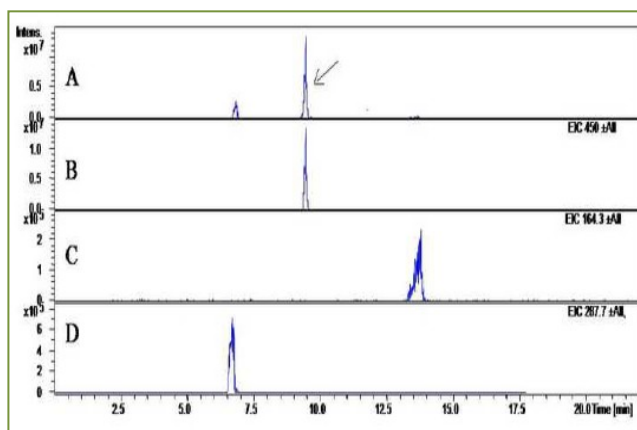
L'analisi CE-MS della miscela di reazione tra TEGDMA e NAC ha rivelato la formazione di un addotto NAC-TEGDMA (**Fig.5A, freccia**).

I grafici Extracted Ion Current (EIC) relativi ad una miscela NAC-TEGDMA sono mostrati nei pannelli B-D.

Il picco relativo all'addotto NAC-TEGDMA ( $m/z450,3 [M+H]^+$ ) è presente nel **pannelloB**. Il picco a  $m/z164,1, [M+H]^+$  corrispondente la NAC protonato è mostrato nel **pannelloC** e il picco nel **pannelloD** rappresenta il TEGDMA protonato ( $m/z288,0[M+H]^+$ ).

Lo spettro MS degli addotti NAC-TEGDMA mostra un segnale a  $m/z450,2$ , riferito allo ione molecolare e un segnale a  $m/z472,1$  compatibile con il suo addotto sodio  $[M+Na]^+$  (**Fig.6**).

L'addotto è stato rilevato nel mezzo extracellulare delle cellule incubate con TEGDMA e NAC per 4 o 24h nonché nei lisati cellulari dopo un periodo di incubazione di 4h. Nessun addotto è stato rilevato nel lisato cellulare dopo un periodo di incubazione di 24h con TEGDMA e NAC.



**Fig.5 Detection of Adduct by CE-MS.**

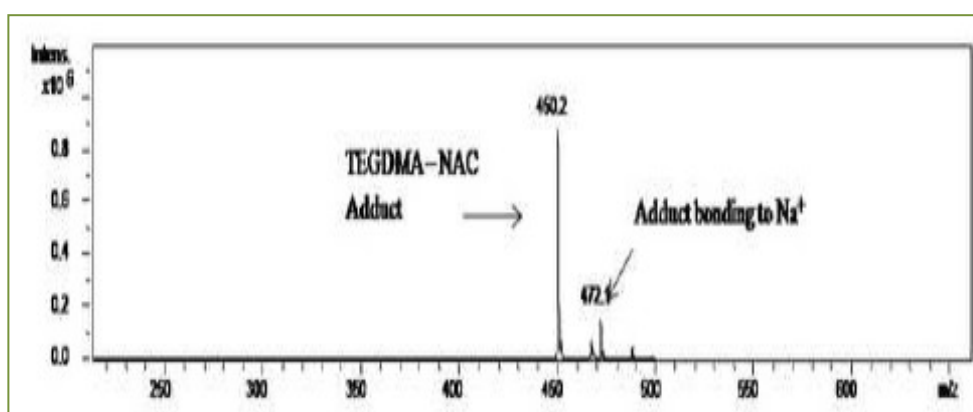
CE-MS analysis of the reaction mixture between TEGDMA and NAC.

Panel A: Full scan MS spectra

Panel B: EIC of TEGDMA-NAC adduct (450 m/z [M+H]<sup>+</sup>)

Panel C: EIC of NAC (164.1 m/z [M+H]<sup>+</sup>)

Panel D: EIC of TEGMA (287.7 m/z [M+H]<sup>+</sup>).



**Fig. 6. Detection of Adduct by CE-MS.**

MS spectrum of the signal corresponding to NACTEGDMA adduct.

The signal 472.1 is due to the NAC-TEGDMA adduct bonding to one Na<sup>+</sup>.

## 4.2 DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, grandi sforzi sono stati fatti dai ricercatori per chiarire i meccanismi coinvolti in effetti citotossici causati dai monomeri metacrilici rilasciati da materiali dentari a base di resina, e di trovare strategie efficaci per ridurre questi inconvenienti. Particolare attenzione è stata focalizzata su molecole come NAC o antiossidanti, in grado di proteggere le cellule dai danni indotti da metacrilati [63].

Di recente, abbiamo suggerito che NAC sia in grado di detossificare i fibroblasti 3T3 contro il danno indotto da HEMA attraverso la formazione di un addotto [64]. Tuttavia non vi è nessuna prova di una reazione simile tra NAC e TEGDMA.

Nel presente studio, abbiamo analizzato la presenza di formazione di addotti tra NAC e TEGDMA in compartimenti extracellulari e intracellulari mediante tecniche di elettroforesi capillare, quantificando anche le effettive concentrazioni intracellulari ed extracellulari di TEGDMA in presenza o assenza di NAC attraverso l'analisi HPLC. In accordo con gli studi precedenti, abbiamo confermato, mediante saggio MTT e citofluorimetria, la citotossicità causata da TEGDMA e la protezione esercitata dal NAC [65]. NAC può fornire precursori del GSH, il suo gruppo solfidrile è fondamentale per la diretta pulizia dei radicali liberi, inclusi i ROS, e può

fungere anche da nucleofilo in grado di legare il  $\beta$ -carbonio elettrofilo della frazione metacrilica, attraverso la reazione di Michael [66]. Inoltre, l'effetto inibitorio di HEMA sulla fosfatasi alcalina (ALP) e la mineralizzazione delle cellule stromali della polpa dentale è impedito dal NAC [67], che potrebbe migliorare la differenziazione osteoblastica delle cellule craniche di topo [68].

È stato dimostrato che NAC fa fronte alla soppressione della differenziazione osteogenica indotta da TEGDMA sulle cellule di osteosarcoma umane MG63 [69] e inibisce la differenziazione della linea cellulare HL-60 mieloide causata da monomeri metacrilici [70].

Nel nostro studio, l'effetto protettivo di NAC sulla vitalità cellulare è coincisa con un decremento della concentrazione extracellulare di TEGDMA (indipendentemente dai valori iniziali) a 0,3mmol/L, il quale è risultato non tossico. Questi dati ci permettono di presumere una reazione tra TEGDMA e NAC il cui legame porta alla formazione di un addotto di Michael. Questa ipotesi è stata inizialmente supportata dall'analisi della miscela di reazione tramite CE-MS, ed è stata definitivamente confermata dal rilevamento di addotti NAC-TEGDMA nel mezzo extracellulare dopo 4h e 24h di incubazione. Ciò mostra chiaramente che NAC causa una riduzione della citotossicità di TEGDMA.

Gli addotti NAC-TEGDMA sono stati osservati nelle cellule dopo un periodo di 4h di incubazione, ma nessuna traccia era rilevabile dopo 24h,



probabilmente perché l'addotto è più solubile in acqua rispetto a TEGDMA e forse facilmente eliminato dal citosol. Questa scoperta può anche suggerire un comune destino metabolico di addotti di TEGDMA con NAC e GSH. È possibile che tali addotti vengono trasformati in acidi mercapturico ed escreto con le urine in vivo [71]. GSH può infatti disintossicare xenobiotici, come metacrilati [72], legandosi attraverso una reazione catalizzata dalla glutatione S-transferasi (GST). La reazione determina esaurimento del GSH cellulare [73] come osservato in diversi studi in vitro che impiegano fibroblasti umani e Cellule HL-60[74].

La bassissima concentrazione intracellulare TEGDMA (solo tracce) sia in presenza o assenza di NAC è stata una sorpresa. Ci aspettavamo di trovare una diminuzione della concentrazione intracellulare di TEGDMA in presenza di NAC.

Tuttavia, è logico ipotizzare che, poiché la principale via metabolica della disintossicazione dei metacrilati avviene mediante idrolisi catalizzata da esterasi, il monomero è stato rapidamente ed enzimaticamente convertito in acido metacrilico [75] come abbiamo scoperto qui in lisati cellulari incubati con TEGDMA.

Come descritto in precedenza, l'acido metacrilico può essere successivamente trasformato, attraverso il pathway della valina, in CO<sub>2</sub> mediante l'acido L-malico o attraverso il pathway epossidico, in acido piruvico.

## **5.2 CONCLUSIONE**

I nostri risultati dimostrano che la capacità di disintossicazione in vitro di NAC contro TEGDMA (Mostrato mediante saggi citotossici) potrebbe avvenire anche attraverso la formazione di un addotto che aiuta a rimuovere il monomero diminuendo la sua concentrazione a valori non tossici. Questi risultati, contribuiscono a chiarire i meccanismi che sono alla base della capacità di disintossicazione del NAC contro metacrilati, spianando la strada per la realizzazione di materiali più biocompatibili.

## **Biocompatibilità in vitro degli Adesivi HEMA-Free**

Fin dagli anni '70 l'Odontoiatria è stata caratterizzata da una rivoluzione innescata con l'introduzione di nuovi materiali dentali a base di resine (RDBM), che hanno orientato la pratica clinica verso il concetto di adesione alle strutture dentali.

Gli adesivi dentali, infatti, hanno la funzione di agire da interfaccia tra strutture dentali e compositi, per aumentare la ritenzione del restauro, ridurre le microinfiltrazioni e disperdere le sollecitazioni occlusali.

Tutti gli adesivi dentali hanno una struttura simile, con un gruppo funzionale che reagisce con i componenti della dentina, una catena di diversa lunghezza e un gruppo metacrilico che si lega alla resina composita.

Essi comunemente contengono, in quantità significative, il monomero HEMA, tranne alcuni nuovi adesivi a tre fasi "*etch and rinse*" e alcuni one-step, i quali ne sono privi. Poiché è noto che ogni componente di una soluzione adesiva può interferire con le funzioni svolte da questi materiali, è possibile ipotizzare che un adesivo senza HEMA abbia una citotossicità minore. A tal scopo abbiamo fatto un confronto, per valutare citotossicità, vitalità cellulare e produzione di ROS, tra gli Adesivi Hema-Free e l'adesivo OptiBond FL (Kerr, Orange, CA, USA) il quale ne è privo.

## 3.3 RISULTATI

### 3.3.1 Citotossicità di adesivi.

La citotossicità di sei adesivi è stata determinata, su HPC, dopo un periodo di esposizione di 24h attraverso il Test MTT.

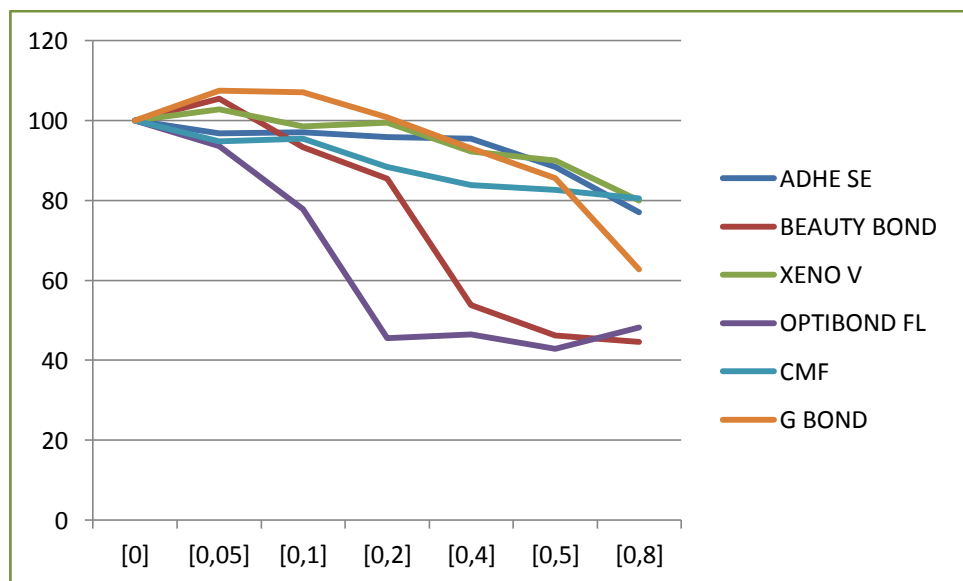
Tutti i materiali inducono un effetto inibitorio dose-dipendente sulla vitalità cellulare (**Fig.1**). La figura mostra che in un intervallo 0-0,05mg/ml non ci sono differenze di citotossicità tra gli adesivi. Neanche a 0,1mM ci sono differenze significative tra la citotossicità dei materiali (**Fig.1**) rispetto alle cellule di controllo.

In particolare, il CMF ( $34,37\% \pm 0,76\%$ ) risulta il meno tossico, mentre la vitalità cellulare più bassa si ha con OptibondFL ( $25,71\% \pm 2,93\%$ ).

A concentrazioni crescenti di adesivi, abbiamo notato sostanziali differenze di vitalità cellulare. In particolare, OptibondFL è il più citotossico, infatti la vitalità cellulare diminuisce rapidamente. Alla concentrazione 0,2mg/ml si ha che:

AdheSE ( $33,58\% \pm 7,57\%$ ) <XenoV ( $31,82\% \pm 6,49\%$ ) <CMF ( $31,82\% \pm 0,92\%$ ) <GBond ( $30,23\% \pm 4,52\%$ ) <BeautyBond ( $28,21\% \pm 9,97\%$ ) <OptibondFL ( $15,06\% \pm 2,21\%$ ).

Alle concentrazioni più elevate OptibondFL e BeautyBond rimangono tra gli adesivi più tossici e alla massima concentrazione testata (0.8mg/ml) XenoV, CMF ed AdheSE sono ancora gli adesivi meno tossici, mentre vi è un aumento significativo della tossicità con GBond (18,82% ± 2,64%).



**Fig.1 Test MTT sugli adesivi.**

Nella figura sono mostrate le citotossicità degli Adesivi Hema-Free ( AdheSE, BeautyBond, XenoV, CMF, GBond), messe a confronto con il controllo privo del monomero (OptiBondFL). AdheSE (33,58% ± 7,57%) <XenoV (31,82% ± 6,49%) <CMF (31,82% ± 0,92%) <GBond (30,23% ± 4,52%) <BeautyBond (28,21% ± 9,97%) <OptibondFL (15,06% ± 2,21%).

### **3.3.2 La proliferazione delle cellule.**

Il saggio dell'Alamar Blu ha mostrato che tutti i materiali causano una diminuzione della proliferazione cellulare in base alla dose e al tempo (**Fig.2**) rispetto alle cellule di controllo. In particolare, dopo 24h dall'esposizione è stata rivelata una diminuzione della proliferazione cellulare con OptibondFL 0,2mg/ml rispetto alle concentrazioni altri materiali (**Fig.2A**). Dopo 72h di esposizione agli adesivi con concentrazioni 0,05-0,2mg/ml abbiamo notato un significativo ritardo nella proliferazione cellulare per BeautyBond e Optibond FL a 0,1 e 0,2mg/ml (**Fig.2B**). È interessante notare che, dopo 1 settimana tutti gli adesivi a 0,2mg/ml determinano una ridotta proliferazione, mentre alle concentrazioni che variano tra 0,05-0,1mg/ml non si sono avuti effetti significativi sulla crescita cellulare (**Fig.2C**).

Parallelamente abbiamo stimolato le cellule HPC con concentrazione tra 0-0,8mg/ml di adesivi per 24h e poi abbiamo rimosso lo stimolo (**Fig.3**). In questo modo abbiamo valutato la capacità di recupero delle cellule dopo 72h e 1 settimana dallo stimolo.

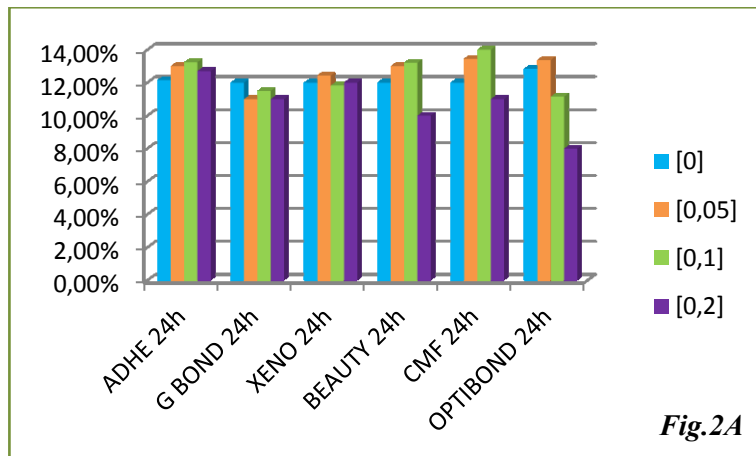
A 24h dall'esposizione delle cellule alle concentrazioni crescenti di adesivi abbiamo notato una diminuzione dose-dipendente della proliferazione cellulare (**Fig.3A**).

In presenza di adesivi, l'inibizione massima della crescita delle cellule si è avuta a 0,8mg/ml nel seguente modo:

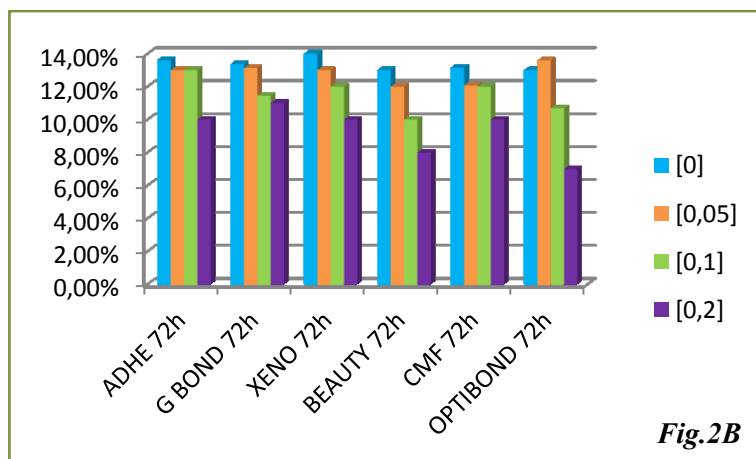
AdheSE (%  $\pm$ %) <XenoV (%  $\pm$ %) <CMF (%  $\pm$ %) <GBond (%  $\pm$ %)  
<BeautyBond (%  $\pm$ %) <OptibondFL (%  $\pm$ %).

Quando gli adesivi sono stati sostituiti con terreno fresco, dopo 72h e 1 settimana abbiamo notato effetti dose-dipendenti per tutti i materiali testati.

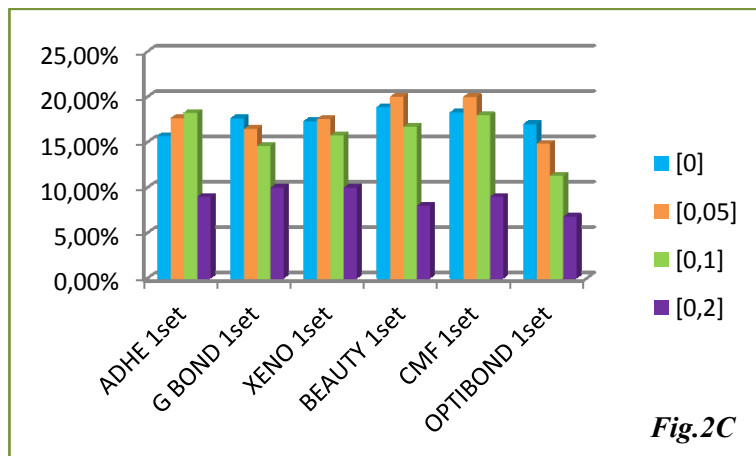
In particolare dopo 72h non c'erano differenze significative tra la proliferazione delle cellule HPC precedentemente esposte agli adesivi e le cellule di controllo rispetto ai risultati ottenuti a 24h (**Fig.3B**). Invece i dati ad una 1 settimana hanno rivelato differenze significative nel tasso di proliferazione cellulare tra il controllo e le cellule precedentemente stimulate (**Fig.3C**). È interessante notare che, dopo 72h e 1 settimana le concentrazioni 0,6 e 0,8mg/ml causano una significativa inibizione della crescita cellulare per tutti gli adesivi, mentre alle concentrazioni più basse (0,2 e 0,4mg/ml) di BeautyBond, CMF e OptibondFL si ha un effetto sulla proliferazione (**Fig.3B-3C**). Dopo 1 settimana, il tasso di proliferazione delle cellule HPC, precedentemente stimulate con concentrazioni più elevate (0,6 e 0,8mg/ml), è rimasto significativamente più basso rispetto alle cellule di controllo con un effetto massimo per BeautyBond e OptibondFL (**Fig.3C**). Cellule stimulate con 0,2 e 0,4mg/ml di Xeno, BeautyBond, CMF e Optibond FL hanno mostrato una diminuzione della proliferazione cellulare rispetto alle cellule di controllo (**Fig.3C**).



**Fig.2A**



**Fig.2B**



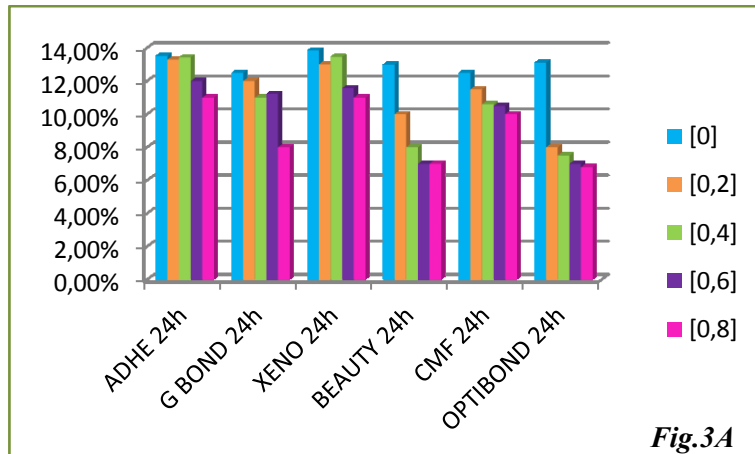
**Fig.2C**

**Fig.2 Proliferazione cellulare a 24h, 72h e 1 settimana con continua stimolazione.**

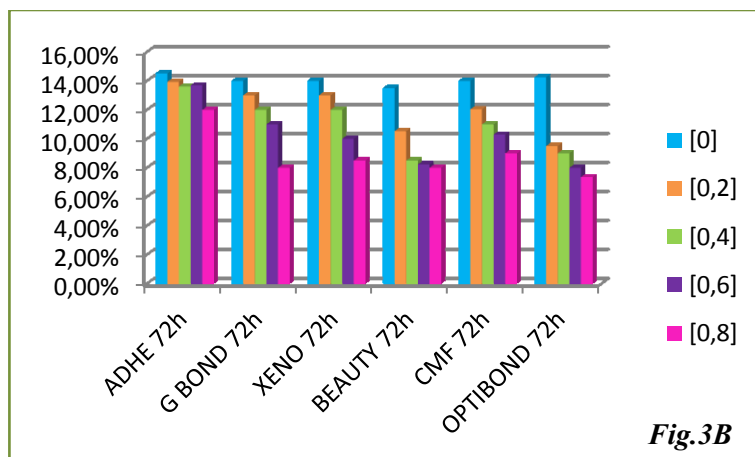
A 24h dall'esposizione c'è una diminuzione della proliferazione cellulare con OptibondFL a 0,2mg/ml (**2A**).

A 72h si nota un significativo ritardo nella proliferazione cellulare per BeautyBond e Optibond FL a 0,1 e 0,2mg/ml (**2B**). A 1 settimana tutti gli adesivi a 0,2mg/ml causano una ridotta proliferazione, mentre alle concentrazioni tra 0,05-0,1mg/ml non si sono hanno effetti significativi sulla crescita cellulare (**2C**).

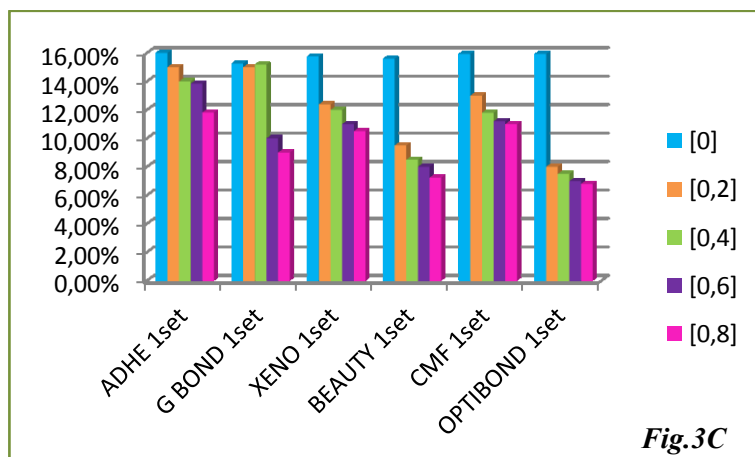




**Fig.3A**



**Fig.3B**



**Fig.3C**

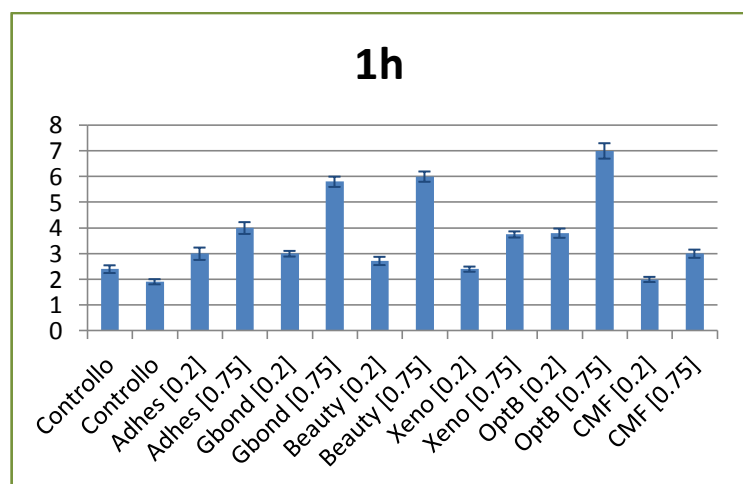
**Fig. 3 Proliferazione cellulare a 24h, 72h e 1 settimana dopo la rimozione dello stimolo**

A 24h dall'esposizione delle cellule alle concentrazioni crescenti di adesivi c'è una diminuzione dose-dipendente della proliferazione cellulare (**3A**).

Dopo 72h e 1 settimana le concentrazioni 0,6 e 0,8mg/ml causano una significativa inibizione della crescita cellulare per tutti gli adesivi, mentre alle concentrazioni più basse (0,2 e 0,4mg/ml) di BeautyBond, CMF e OptibondFL si ha un effetto dose-dipendente (**3B-3C**).

### 3.3.3 ROS produzione.

L'induzione di produzione di ROS sulle HPC è stata determinata dopo 1h e 3h di esposizione ai sei adesivi attraverso DCFH-DA. I nostri risultati hanno dimostrato che, dopo 1h di stimolazione con gli adesivi, vi è una produzione di ROS concentrazione-dipendente rispetto alle cellule di controllo. Alla concentrazione di 0,2mg/ml tutti gli adesivi mostrano un significativo aumento dei livelli di ROS rispetto alle cellule di controllo, eccetto CMF (**Fig.4**). 0,2mg/ml di OptbondFL ha causato l'incremento più elevato di ROS tra tutti i materiali testati (**Fig.4**). 0,8mg/ml ha invece mostrato, per tutti i materiali, notevoli miglioramenti nella produzione di ROS rispetto alla concentrazione 0,2mg/ml. Interessante notare che, GBond, BeautyBond e OptbondFL hanno mostrato un aumento significativo nel livello ROS rispetto agli altri adesivi (**Fig.4**).



**Fig.4 Produzione di ROS**

Dopo 1h di stimolazione con gli adesivi, vi è una produzione di ROS concentrazione-dipendente rispetto alle cellule di controllo. GBond, BeautyBond e OptbondFL hanno mostrato un aumento significativo nel livello ROS rispetto agli altri adesivi.

### 4.3 DISCUSSIONE

Lo studio sulla tossicità molecolare dei monomeri usati in resine dentali ha assunto notevole importanza nel campo delle scienze biomediche. Questo fenomeno ha avuto luogo dopo l'osservazione di effetti tossici locali e sistemici derivanti dal rilascio di monomeri di materiali dentari [76].

È stato anche dimostrato che questo componente, spesso presente in resine adesive, ha la capacità di diffondere attraverso i tubuli dentinali e raggiungere il tessuto pulpare a concentrazioni significativamente elevate nel range dei millimolari [77].

Durante gli ultimi anni, è stato argomento di ricerca non solo l'attività antibatterica dei materiali, ma soprattutto la tossicità dei materiali utilizzati in odontoiatria, il quale si è rivelato essere uno dei principali problemi della comunità odontoiatrica [78].

Il monomero non polimerizzato può venire a contatto con la mucosa orale o faringea o addirittura può essere ingerito. È stato dimostrato che, il composito può entrare nel corpo e venire metabolizzato con conseguente formazione di radicali intermedi e determinare effetti tossici [79]. In particolare, studi precedenti hanno dimostrato che HEMA provoca la produzione di ROS.

Morte e sopravvivenza cellulare sono controllati da una serie di fattori all'interno della cellula, compreso un equilibrio tra la produzione di ROS e sistemi antiossidanti [80], infatti i ROS sono coinvolti nella regolazione della crescita cellulare, differenziamento e morte cellulare [81].

In questo studio sono stati analizzati alcuni dei nuovi sistemi adesivi privi di HEMA (CMFAdhesiveSystem<sup>®</sup>, BeautyBond, XenoV<sup>®</sup>, GBond<sup>™</sup>, AdheSE One<sup>®</sup>) e la loro citotossicità è stata messa a confronto rispetto ad un sistema adesivo convenzionale contenente il monomero (OptiBond<sup>™</sup>FL), per lo scopo sono stati impiegati due metodiche: MTT Assay e dosaggio dell'Alamar Blue.

I dati mostrano che gli adesivi sono caratterizzate da un aumento della citotossicità in modo concentrazione-dipendente. In particolare, i nostri risultati dimostrano che il controllo OptibondFL, il quale contiene il monomero HEMA, è più tossico degli adesivi senza HEMA.

Il comportamento del controllo riflette l'attività del monomero e mostra una riduzione dell'attività della deidrogenasi mitocondriale in funzione del tempo e in modo concentrazione-dipendente, in accordo con studi precedenti [82,83].

La minore tossicità degli adesivi HEMA-free, conferma che questo componente citotossico, il quale viene rilasciato dagli agenti che legano la dentina, è sostanza candidata a causare effetti negativi nei tessuti orali e il

fenomeno della diminuzione della vitalità è in accordo con le altre relazioni [84].

La citotossicità è certamente connessa al rilascio di monomeri come HEMA, quindi gli adesivi privi di monomero sono decisamente meno tossici.

Per rendere i dati confrontabili tra i diversi materiali utilizzati, che inducono una varietà di differenti risposte citotossiche, è stata calcolata la percentuale di proliferazione cellulare a ciascuna dose e confrontando l'assorbanza di ogni dose con quella del controllo negativo. Le curve dose-dipendenti sono state generate confrontando la percentuale di inibizione della proliferazione cellulare per ciascuna dose testata.

L'analisi sulla proliferazione cellulare ha dimostrato che basse concentrazioni di agente stimolante non influenzano la proliferazione cellulare, sia se quotidianamente rinnovato, sia se somministrato in una singola dose.

Tuttavia, con concentrazioni crescenti di adesivo viene osservato l'arresto del processo proliferativo in tutti i campioni testati. Inoltre, la proliferazione cellulare effettuata rinnovando le dosi giornaliere di adesivo, ha mostrato che l'unico sistema contenente HEMA esercita un effetto inibitorio sulla crescita cellulare anche a basse concentrazioni (0.2mg/ml). Questo risultato è confermato anche dall'analisi sulla produzione di ROS da parte di cellule stimulate con i sistemi adesivi.

Infatti, in questo studio abbiamo misurato la formazione di ROS in cellule della polpa stimulate con nostri sei adesivi a 0,2mg/ml e 0.75mg/ml dopo 1h e 3 h.

DCFH-DA (2'7''- *Diclorodiidrofluoresceina Diacetata*) è stato usato come substrato per misurare la produzione intracellulare di ossidante in cellule umane della polpa dentale (HPC) mediante citometria a flusso.

DCFH-DA è idrolizzato enzimaticamente dalle esterasi in diclorofluorescina(DCFH), il quale viene intrappolato all'interno della cellula. Questa molecola non fluorescente viene poi ossidata in diclorofluorescina ad alta fluorescenza (DCF) per azione di ossidanti cellulari. La fluorescenza intracellulare di DCF può essere usato per quantificare lo stress ossidativo e confrontare la produzione di ROS tra colture cellulari stimulate con adesivi HEMA-Free e colture cellulari stimulate con adesivi contenenti il monomero **[85]**.

Come previsto e in accordo con studi precedenti, in generale, è possibile osservare, dopo 1h di stimolazione con gli adesivi, una produzione di ROS per tutti i materiali testati, in modo dipendente dalla concentrazione **[86]**.

I nostri dati mostrano che, dopo 1h, OptibondFL, che contiene il monomero HEMA, induce un significativo aumento di ROS anche a basse concentrazioni, e questo fenomeno è legato alla grande riduzione della vitalità cellulare come rivelato dal Test dell'MTT.

Inoltre, OptibondFL determina una riduzione della proliferazione dose-dipendente, sia quando usato per stimolare le cellule in modo costante, sia quando viene utilizzato per una stimolazione singola.

Questi dati indicano che gli effetti citotossici e la proliferazione cellulare dipendono dalla capacità del monomero di produrre specie di ossigeno reazione. Tuttavia, tra i sistemi adesivi analizzati, il CMF, che non contiene monomeri metacrilati, non induce un aumento della produzione di radicali.

Infatti, alla concentrazione 0.2mg/ml tutti gli adesivi, eccetto CMF, mostrano un significativo aumento dei livelli di ROS rispetto a cellule di controllo, mentre Optibond 0.2mg/ml ha causato l'incremento maggiore tra i materiali testati. La formazione di ROS si verifica come naturale processo cellulare, ma sono anche i risultati dell'esposizione delle cellule ai raggi UV, alle radiazioni ionizzanti (IR) e le sostanze chimiche [87].

Un aumento dei livelli intracellulari di ROS è associata ad una modificazione nelle vie di trasduzione dei segnali cellulari che regolano la sopravvivenza, proliferazione o apoptosi in presenza di piccoli monomeri come TEGDMA o HEMA [88]. Studi precedenti hanno dimostrato la capacità di HEMA di agire a livello di importanti pathways intracellulari deputati alla differenziazione, alla sopravvivenza e alla morte cellulare.

Infatti, è stato dimostrato che questo monomero è in grado di inibire, nei fibroblasti pulpari umani, l'attivazione di AKT, una proteina chinasi importante per la proliferazione cellulare [89].

I dati ottenuti sono in linea con studi precedenti, e hanno dimostrato che l'esposizione ad HEMA ha causato l'esaurimento delle riserve di glutazione (GSH) all'interno della cellula e la conseguente produzione di radicali, in fibroblasti gengivali umani [90].

Infatti, monomeri come 2-idrossietil-metacrilato (HEMA) disturbano le funzioni cellulari incluse le risposte del sistema immunitario, la differenziazione e possono indurre la morte cellulare per apoptosi [91].

La sfida più importante per gli adesivi utilizzati in odontoiatria è la produzione di un legame duraturo e molecole con poco o nessun potenziale citotossico [92]. Pertanto, è ancora una necessità clinica, per un adesivo che consente un legame duraturo, un'applicazione che sia semplice e a bassa tossicità.

### **5.3 CONCLUSIONE**

Gli adesivi smalto-dentinali attualmente sul mercato sono in grado di rilasciare monomeri attraverso i tubuli dentinali dopo il processo di polimerizzazione. Gli adesivi testati sono stati in grado di esercitare effetti citotossici su fibroblasti primari della polpa umana, tuttavia, gli adesivi HEMA-free sono più biocompatibili rispetto ai sistemi tradizionali contenenti.



## Bibliografia

1. **Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN.** *Recent advances and developments in composite dental restorative materials.* J Dent Res 2011;90:402-16
2. **Ferracane JL.** *Resin composite--state of the art.* Dent Mater 2011;27:29-38
3. **Chen MH.** *Update on dental nanocomposites.* J Dent Re. 2010;89:549-60
4. **Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ.** *Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials.* Dent Mater 2012;28:87-101
5. **Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B.** *Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives.* Biomaterials 2007;28:3757-85
6. **Michelsen VB, Moe G, Skalevik R, Jensen E, Lygre H.** *Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS.* J Chromatogr. B Anal Tech Bio Life Sci 2007;850:83–91
7. **Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG.** *Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts.* J Dent Res 1991;70:1450-5
8. **Geurtsen W.** *Biocompatibility of resin-modified filling materials.* Crit Rev Oral Biol Med 2000;11:333-55
9. **Nocca G, Ragno R, Carbone V, Martorana GE, Rossetti DV, Gambarini G, Giardina B, Lupi A.** *Identification of glutathione-methacrylates adducts in gingival fibroblasts and erythrocytes by HPLC-MS and capillary electrophoresis.* Dent Mater 2011;27:e87-98
10. **Geurtsen W.** *Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements.* Eur J Oral Sci 1998;106: 687–695
11. **Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G.** *Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers.* J Dent Res 2006;85:870–877
12. **Nakabayashi N, Saimi Y.** *Bonding to intact dentin.* J Dent Res 1996; 75:1706-1715
13. **Geurtsen W.** *Biocompatibility of resin modified filling materials.* Crit Rev Oral Biol Med 2000; 11:333-355

14. **Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R.** *Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines.* Arch Oral Biol. 2004; 49:125-31.
15. **Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH.** *Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA.* Biomaterials 2005; 26:745-53
16. **Schweickl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, Schmalz G.** *Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine.* Dent Mater 2007; 23:688-95
17. **Eckhardt A, Harorli T, Limtanyakul J, Hiller KA, Bosl C, Bolay C, et al.** *Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate.* Biomaterials 2009; 30:1665-74
18. **Schmalz G, Krifka S, Schweickl H.** *Toll-like receptors, LPS, and dental monomers.* Adv Dent Res 2011;23:302-6
19. **Galler K, Schweickl H, Hiller KA, Cavender A, Bolay C, D'Souza R, Schmalz G.** *TEGDMA reduces the expression of genes involved in biomineralization.* J Dent Res 2011;90:257-62
20. **Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W.** *Effects of HEMA and TEGDMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth.* Dent Mater 2011;27:608-17
21. **Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W.** *Effects of resinous monomers on the odontogenic differentiation and mineralization potential of highly proliferative and clonogenic cultured apical papilla stem cells.* Dent Mater 2012;28:327-39
22. **Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L.** *TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts.* Biomaterials 2005; 26: 5130–5137
23. **Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W.** *Effects of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts.* J Biomed Mater Sci 2002; 63: 746–751
24. **Geurtsen W, Leyhausen G.** *Chemical–biological interaction of the resin monomer triethyleneglycoldimethacrylate (TEGDMA).* J Dent Res 2001; 80:2046–2050

25. **Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, Schmalz G.** *Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate.* Biomaterials 2008;29:1377–1387
26. **Van Landuyt K, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y et al.** *Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives.* J Dent Res 2005;84: 183-188
27. **Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, Navarro MF, Santos CF.** *Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials.* J Appl Oral Sci 2009;17:544-54
28. **Kohen R, Nyska A.** *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification.* Toxicol Pathol 2002;30:620-50
29. **Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W.** *TEGDMA cause apoptosis in primary gingival fibroblasts.* J Dent Res 2003; 82: 814-818
30. **Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H.** *The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives.* Dent Mater 2008;3: 362–71
31. **Yeh HW, Chang MC, Lin CP, Tseng WY, Chang HH, Wang TM, et al.** *Comparative cytotoxicity of five current dentin bonding agents: role of cell cycle deregulation.* Acta Biomater 2009;5:3404–10
32. **Dröge W.** *Free radicals in the physiological control of cell function.* Physiol Rev 2002;82:47–95
33. **Pervaiz S, Taneja R, Ghaffari S.** *Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells.* Antioxid Redox Signal 2009; 11:2777-89
34. **Genestra M.** *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants.* Cell Signal 2007;19:1807-19
35. **Martindale JL, Holbrook NJ.** *Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.* J Cell Physiol 2002;192:1–15
36. **Kern JC, Kehrer JP.** *Free radicals and apoptosis: relationships with glutathione, thioredoxin, and the BCL family of proteins.* Front Biosci 2005;10:1727–38
37. **Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P.** *Redox regulation of cell survival.* Antioxid Redox Signal 2008;10:1343-74.
38. **Circu ML, Aw TY.** *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis.* Free Radic Biol Med 2010;48:749-62

39. **Forman HJ, Zhang H, Rinna A.** *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.* Mol Aspects Med 2009;30:1-12
40. **Lu SC.** *Regulation of glutathione synthesis.* Mol Aspects Med 2009;30:42-59
41. **Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B.** *How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach.* Dent Mater 2011;27:723-47
42. **Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paternò R, Schweikl H, et al.** *NF- $\kappa$ B protection against apoptosis induced by HEMA.* J Dent Res 2004;83:837-42
43. **Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H.** *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA induced apoptosis in primary human pulp cells.* J Dent Res 2004;83:703-7
44. **Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL and Chambers TJ.** *A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss.* J Clin Invest, 2003; 112:915-923
45. **Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR and Jewett A.** *N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells.* Free Radic Biol Med, 2007; 43:1394-1408
46. **Pawlowska E, Poplawski T, Ksiazek D, Szczepanska J, Blasiak J.** *Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate.* Mutat Res 2010;696:122-9
47. **Nocca G, D'Antò V, Desiderio C, Rossetti DV, Valletta R, Marquez Baquala A, Schewikl H, Lupi A, Rengo S and Spagnuolo G.** *N-acetyl cysteine directed detoxification of 2 hydroxyethyl methacrylate by adduct formation.* Biomaterials, 2010; 31:2508-2516
48. **Samuelsen JT, Kopperud HM, Holme JA, Dragland IS, Christensen T and Dahl JE.** *Role of thiol-complex formation in 2-hydroxyethyl- methacrylate-induced toxicity in vitro.* J Biomed Mater Res A, 2011; 96:395-401
49. **Schmalz G.** *Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials— Advantages and limitations.* J Dent 1994;22:S6-S11
50. **Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, Blasiak J.** *2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation.* Mol Biol Rep 2012;39:1561-74.
51. **Ferracane JL.** *Elution of leachable components from composites.* J Oral Rehabil 1994;21:441-452

52. **Gulden M, Morchel S, Seibert H.** *Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: Cell concentration.* Toxicol in Vitro 2001;15:233–243
53. **Ansteinsson V, Solhaug A, Samuelsen JT, Holme JA, Dahl JE.** *DNA-damage, cell-cycle arrest and apoptosis induced in BEAS-2B cells by 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA).* Mutat Res 2011; 723:158-64
54. **Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, Dai W, Darzynkiewicz Z.** *Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents.* Cytometry A 2007;71:648-61
55. **Gulden M, Morchel S, Seibert H.** *Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: Cell concentration.* Toxicol in Vitro 2001;15:233–243
56. **Williams AC, Barry BW.** *Penetration enhancers.* Adv Drug Deliv Rev 2004;56:603–618
57. **Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, P\_erianin A.** *TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species.* J Biomed Mater Res A 2003;66:476–482
58. **Rodriguez-Burford C, Oelschlager DK, Talley LI, Barnes MN, Partridge EE, Grizzle WE.** *The use of dimethyl sulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines.* Biotech Histochem 2003;78:17–21
59. **Durner J, Walther UI, Zaspel J, Hickel R, Reichl FX.** *Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells.* Biomaterials 2010;31: 818–823
60. **Samuelsen JT, Holme JA, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl JE.** *HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro.* Dent Mater 2008; 24:134-40
61. **Freeman ML, Huntley SA, Meredith MJ, Senisterra GA, Lepock J.** *Destabilization and denaturation of cellular protein by glutathione depletion.* Cell Stress Chaperones 1997;2:191–198
62. **Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ.** *Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro.* Dent Mater 2004;20:12–20

63. **Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A.** *N-acetyl cysteine mediates protection from 2-hydroxyethyl methacrylate induced apoptosis via nuclear factor kappa B dependent and independent pathways: potential involvement of JNK.* Toxicol Sci, 2009; 108:356-366
64. **Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX.** *Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay.* Biomaterials 2006;27:1762-70
65. **Lum H, Roebuck KA.** Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol 2001;280:C719-41
66. **Kehrer JP.** *The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity.* Toxicology 2000; 149:43-50
67. **Imlay JA.** *Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide.* Annu Rev Biochem 2008;77:755-76
68. **Jun JH, Lee SH, Kwak HB, Lee ZH, Seo S-B, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS and Baek JH.** *N-acetylcysteine stimulate osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells.* J Cell Biochem, 2008; 103:1246–1255
69. **Kim NR, Lim BS, Park HC, Son KM and Yang HC.** *Effects of N-acetylcysteine on TEGDMA and HEMA-induced suppression of osteogenic differentiation of human osteosarcoma MG63 cells.* J Biomed Mater Res Part B, 2011; 98B:300-307
70. **Nocca G, Martorana GE, De Sole P, De Palma F, Callà C, Corsale P, Antenucci M, Gambarini G, Chimenti C, Giardina B and Lupi A.** *Effects of 1,4-butanediol dimethacrylate and urethane dimethacrylate on HL-60 cell metabolism.* Eur J Oral Sci, 2009; 117:175-181
71. **Greim H, Ahlers J, Bias R, Broecker B, Hollander H, Gelbke HP, S Jacobi, -, Klimisch H-J, Mangelsdorf I, Mayr W, Schön N, Stropp G, Stahnecker P, Vogel R, Weber C, Ziegler<sup>15</sup> Skylakakis K and Bayer E.** *Assessment of structurally related chemicals: toxicity and ecotoxicity of acrylic acid and acrylic acid alkyl esters (acrylates), methacrylic acid and methacrylic acid alkyl esters (methacrylates).* Chemosphere, 1995; 31:2637-2659
72. **Boylard E and Chasseaud LF.** *Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds.* Biochem J, 1967; 104:95–102

73. **Griffith OW, Meister A.** *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butylHomocysteineSulfoximine).* J Biol Chem 1979;254:7558-60
74. **Lefevre M, Bourd K, Loriot MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A, Stanislawski L.- et al.** *TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts.* J Dent Res, 2004; 83:914–919
75. **Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N.** *Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006; 291:G1-7
76. **Rota C, Chignell CF, Mason RP.** *Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'- dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'- dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements.* Free Rad Biol Med 1999;27:873-881
77. **Williams DF.** *On the nature of biomaterials.* Biomaterials 2009;30:5897-909
78. **Poplawski T, Pawlowska E, Wisniewska-Jarosinska M, Ksiazek D, Wozniak K, Szczepanska J, Blasiak J.** *Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate.* Chem Biol Interact. 2009;180:69–78.
79. **Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al.** *Stimulation of glutathione depletion ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA.* Biomaterials 2005;26:745–53
80. **Finkel T.** *Oxidant signals and oxidative stress.* Curr Opin Cell Biol 2003;15:247–54
81. **Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.** *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.* Mol Cell Biochem. 2004; 266:37-56
82. **Krifka S, Petzel C, Hiller K-A, Frank E-M, Bosl C, Spagnuolo G, et al.** *Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells.* Biomaterials 2010;31:2964–75.
83. **Spagnuolo G, D'Antò V, Valletta R, Strisciuglio C, Schmalz G, Schweikl H, et al.** *Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on human pulp cell survival pathways ERK and AKT.* J Endod 2008;34(6):684–8
84. **Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS.** *MAP kinases and the control of nuclear events.* Oncogene.2007;26:3240-53
85. **LeBel CP, Ishiropoulos H, Bondy SC** *Evaluation of the probe 2, 7-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.* Chem Res Toxicol 1992 5:227– 231.

86. **Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H** *The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives.* Dent Mater 2008 24:362–371
87. **Engelmann J, Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W** *ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005 75:272–276
88. **Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B.** *How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach.* Dent Mater 2011;27:723-47.
89. **Seiss M, Langer C, Hickel R, Reichl FX.** *Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS.* Arch Toxicol 2009;83:1109-15.
90. **Costa CA, Hebling J, Hanks CT.** *Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review.* Dent Mater 2000;16:188-97.
91. **Murray PE, Hafez AA, Windsor LJ, Smith AJ, Cox CF.** *Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities.* J Dent 2002;30:213-22
92. **Liu Y, Tjaderhane L, Breschi L, et al.** *Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation.* J Dent Res 2011;90(8):953:968