

Giuseppina Nocca¹
Pasquale De Sole¹
Gianluca Gambarini²
Francesco De Palma¹
Luca Testarelli²
Alessandro Lupi³

¹ Istituto di Biochimica e Biochimica
Clinica - Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università Cattolica, Roma
² Istituto Dipartimentalizzato di Clinica
Odontoiatrica, Università degli Studi di
Roma "La Sapienza"
³ Istituto di Chimica del Riconoscimento
Molecolare, C.N.R., Sezione di Roma
c/o Istituto di Biochimica e Biochimica
Clinica - Facoltà di Medicina e Chirurgia-
Università Cattolica, Roma

Corrispondenza:
Dott.ssa Giuseppina Nocca
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica
Facoltà di Medicina e Chirurgia
L.go Francesco Vito 1
00168 Roma
Tel.: 0630154215 - Fax 063053598
E-mail: g.nocca@rm.unicatt.it

Un nuovo approccio per la valutazione della biocompatibilità di materiali per endodonzia

A new approach for the evaluation of biocompatibility of endodontic materials

RIASSUNTO

Obiettivo: il bisfenolo A glicerolato (1 glicerol/fenolo) dimetil acrilato, il diuretano dimetil acrilato ed il 1,4 butandiolo dimetil acrilato sono monomeri presenti nelle resine composite per uso odontoiatrico e studi riguardanti la loro biocompatibilità sono ampiamente presenti in letteratura. In questo studio è stato valutato l'effetto dei suddetti composti su granulociti polimorfonucleati isolati da sangue periferico: a tal scopo è stata analizzata la produzione di specie reattive dell'ossigeno tramite analisi di chemiluminescenza, tecnica che misura la produzione di Specie reattive dell'Ossigeno da parte di cellule.

Metodi: i monomeri sono stati messi a contatto con le cellule. Dopo 1 ora di incubazione la vitalità cellulare è stata determinata tramite colorante trypan blue e la quantità di radicali dell'ossigeno prodotti da 100.000 granulociti (sia non stimolati che stimolati con zymosan) è stata valutata tramite chemiluminescenza per un periodo di 2 h. Ogni esperimento, realizzato in triplicato e ripetuto sei volte, ha portato a risultati che sono stati espressi come media \pm SD.

Risultati: i monomeri esaminati non hanno mostrato una diretta azione citotossica; ciononostante la luminescenza basale dei granulociti decresce quando la concentrazione dei monomeri aumenta. Il bisfenolo A glicerolato (1 glicerol/fenolo) dimetil acrilato ed

il diuretano dimetil acrilato riducono anche il burst ossidativo.

Conclusioni: l'effetto del butandiolo dimetil acrilato è molto interessante a causa del coinvolgimento dei granulociti in patologie infiammatorie sia gravi che moderate sebbene la rilevanza clinica del fenomeno rimanga ancora da essere valutata.

Parole chiave:

Granulociti polimorfonucleati, monomeri metilacrilici, burst ossidativo, chemiluminescenza.

ABSTRACT

Aim of the work: bisphenol A glycerolate (1 glycerol/phenol) dimethacrylate, diurethane dimethacrylate and 1,4-butanediol dimethacrylate are methacrylic monomers present in dental composite resins. The aim of the present work is the evaluation of the functionality polymorphonucleate cells when brought in contact with different concentrations of monomers.

Methods: ROS metabolism was studied by chemiluminescence, the measures were performed at 25°C during 2. All the experiments were performed in triplicates.

Results: bisphenol A glycerolate (1 glycerol/phenol) dimethacrylate, diurethane dimethacrylate and induce a decrease of both basal and stimulated reactive oxygen species production.

1,4-butanediol dimethacrylate, on the contrary, it does not alter total oxidative burst in presence of stimulus while induces a statistically significant decrease of basal reactive oxygen species production.

Conclusions: the effect of 1,4-butanediol dimethacrylate appear interesting because of the involvement of polymorphonucleates in many severe and moderate inflammatory diseases, although the actual clinical relevance of the phenomenon remains to be evaluated.

Key words:

Granulocytes, methacrylic monomers, oxidative burst, chemiluminescence.

INTRODUZIONE

Uno dei parametri fondamentali che deve essere attualmente considerato nella valutazione dei materiali utilizzati in campo odontoiatrico è la biocompatibilità, cioè la capacità di svolgere la loro funzione in assenza di reazioni biologiche avverse che possono essere dovute sia alla tossicità del materiale stesso che ad altri fattori quali la proliferazione batterica, etc. (1).

Le resine composite utilizzate in campo endodontico possono entrare in contatto con i tessuti vitali della polpa durante le procedure di restauro oppure con i tessuti periapicali durante i re-

stauri con adesivi. Nella matrice organica delle suddette resine sono presenti monomeri metilacrilici, quali il diuretano dimetil acrilato (DUDMA, Fig. 1), il 1,4-butanediolo dimetil acrilato (BDDMA, Fig. 2) ed il bisfenolo A glicerolato (1 glicerol/fenolo) dimetil acrilato (Bis-GMA, Fig. 3). Durante la reazione di polimerizzazione, i monomeri sono rapidamente trasformati in una rete solida di macromolecole ma il processo non è mai completo ed una certa percentuale di composti a basso peso molecolare rimane inglobata nella struttura. La non totale conversione comporta una riduzione delle caratteristiche meccaniche (2, 3) del materiale ed il rilascio delle sostanze che non hanno reagito completamente con possibili conseguenti effetti indesiderati quali reazioni allergiche (4), tossicità sistemica, citotossicità, estrogenicità e mutagenicità (5, 6).

Gli studi riguardanti la biocompatibilità dei materiali dentali includono attualmente sia i classici saggi di citotossicità, che gli esperimenti riguardanti le interazioni tra materiali e cellule ospiti necessari per meglio comprendere le cause degli effetti avversi osservati occasionalmente nella pratica clinica. Sebbene gli esperimenti *in vitro* con cellule non siano in grado di riprodurre strettamente le condizioni presenti *in vivo*, essi sono largamente utilizzati per la possibilità di analizzare separatamente l'azione di xenobiotici sulle popolazioni cellulari. Un'altra importante applicazione dei saggi *in vitro* riguarda la possibilità di valutare l'effetto di concentrazioni sub-citotossiche dei monomeri metilacrilici per quanto riguarda le alterazioni della funzionalità cellulare: è stata infatti suggerita una possibile interazione tra i suddetti composti ed il sistema dei monociti-macrofagi (7-11), valutando sia l'interleuchina-1 β ed il *tumor necrosis factor- α* (mediatori dell'infiammazione prodotti dai macrofagi) (12) che il *burst* ossidativo (11). I metilacrilati potrebbero anche interagire con i polimorfonucleati (PMN), ma su quest'ultimo fenomeno non sono a tutt'oggi riportate evidenze in letteratura.

Durante il *burst* ossidativo associato alla fagocitosi, sia i macrofagi che i PMN producono, mediante il complesso en-

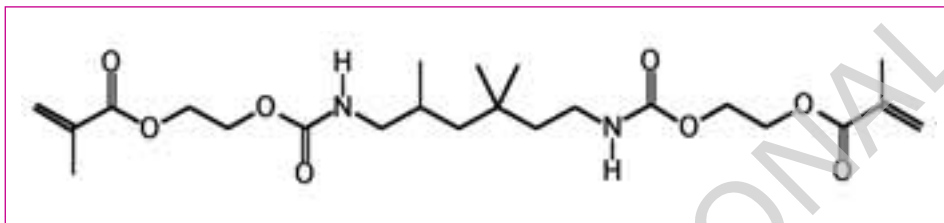


Fig. 1 - Struttura chimica del diuretano dimetil acrilato (DUDMA).

zimatico NADPH ossidasi di membrana, specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono essere valutate tramite la chemiluminescenza (CL). Dopo l'assemblaggio del suddetto complesso enzimatico sulla membrana plasmatica, vengono prodotti l'anione superossido (O_2^-), il perossido d'idrogeno e l'acido ipocloroso (13), con possibili conseguenti danni ai tessuti circostanti il si-

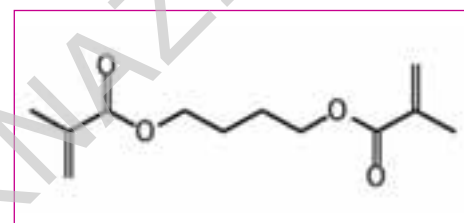


Fig. 2 - Struttura chimica del 1,4-butanediolo dimetilacrilato (BDDMA).

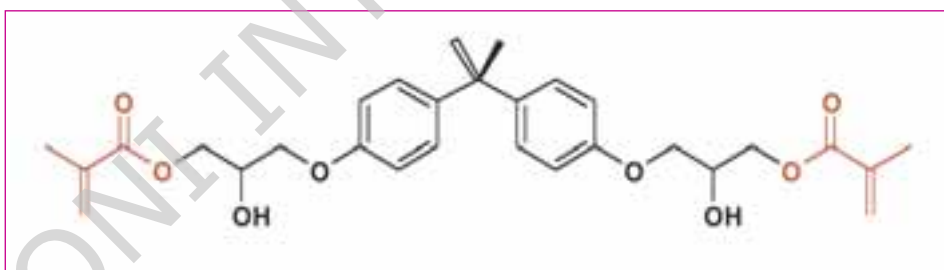


Fig. 3 - Struttura chimica del bisfenolo A glicerolato (1 glicerol/fenolo) dimetil acrilato (bis-GMA).

to d'infiammazione (14-16).

Differenti fenotipi caratterizzano gli stati di attivazione (quiescente, *primed* o attivato) della NADPH ossidasi nei PMN: nello stato quiescente i PMN circolanti appaiono tondeggianti (17) mentre la loro forma cambia durante la fase di *priming* nella quale cominciano ad acquisire la capacità di aderire ai vasi e di rispondere a stimoli antigenici (17). Infine, nello stato attivato i PMN raggiungono il sito di infezione ed iniziano la fagocitosi ed il *burst* ossidativo (17). Alterazioni nei suddetti stati provocano conseguenze patologiche importanti tra cui la granulomatosi cronica (quando c'è una diminuzione della funzionalità del complesso enzimatico) o il danneggiamento di organi o tessuti in caso di iper-attivazione della NADPH ossidasi in un sito inappropriato (18).

Alla luce di queste evidenze sembra importante - per un completo ed approfondito studio della biocompatibi-

lità delle resine composite - analizzare gli effetti dei monomeri metilacrilici sui PMN per verificare una possibile alterazione del *burst* ossidativo.

Scopo del presente lavoro è quindi quello di valutare la funzionalità *in vitro* dei PMN dopo incubazione con Bis-GMA, BDDMA e DUDMA a differenti concentrazioni.

MATERIALI E METODI

Se non diversamente indicato, tutti i prodotti chimici ed i reagenti (*cell culture grade*) sono stati forniti da Sigma-Aldrich srl, Milano, Italia. Ogni donatore ha espresso il consenso informato.

Isolamento dei polimorfonucleati

Sono stati diluiti 10 mL di sangue periferico di donatori sani con 10 mL di so-

luzione fisiologica a cui sono stati successivamente aggiunti 4 mL di una soluzione al 6% di destano in fisiologica per aumentare la velocità di sedimentazione eritrocitaria. Dopo 30 min., la sospensione ricca di leucociti è stata centrifugata su Lymphoprep (Pharmacia, Uppsala, Sweden), secondo le istruzioni del produttore, per rimuovere le cellule mononucleate contaminanti ed il pellet è stato infine sottoposto a lisi ipotonica per rimuovere gli eritrociti residui. I PMN recuperati sono stati lavati tre volte e risospesi alla concentrazione di 200.000 cellule/mL, in una soluzione di Krebs Ringer Fosfato (KRP) a pH 7,4.

Trattamento dei polimorfonucleati con i monomeri

A causa dei diversi livelli di citossicità (TC_{50}) di ogni monomero (19) sono state preparate soluzioni di partenza in dimetilsolfossido (DMSO), a differenti concentrazioni per ogni monomero.

BDDMA: 0.1 mol/L, 0.2 mol/L e 0.4 mol/L

DUDMA: 13 mmol/L, 27 mmol/L e 55 mmol/L

Bis-GMA: 4 mmol/L, 8 mmol/L e 16 mmol/L

Come procedura generale, 1 mL di una delle suddette soluzioni è stato aggiunto ad 1 mL del terreno di coltura RPMI1640 contenente PMN (100000) ed il tutto è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Durante tutti gli esperimenti la concentrazione finale di DMSO è stata pari allo 0.1% (v/v) in tutti i campioni.

Dopo l'incubazione le cellule sono state centrifugate per rimuovere il sovrantante, lavate con PBS, - raccolte e contate con il trypan blue (20) per valutarne la vitalità.

Saggi di funzionalità

Il metabolismo dei ROS da parte dei PMN è stato studiato tramite chemiluminescenza (21) con un sistema costituito da luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione, 100 nnol/L) e PMN (100.000), in presenza o in assenza dello stimolo costituito da zymosan opsonizzato (0.5 mg). Il volume finale (1 mL) è stato ottenuto aggiungendo KRP e l'attività di chemiluminescenza è stata determinata a 25°C per 2 ore con un luminometro LB 953

(Berthold, EG&G Co, Germania). Tutti gli esperimenti sono stati - realizzati in triplicato. Il parametro di chemiluminescenza considerato per l'analisi è stato il seguente:

$$\text{Indice di Trattamento (I.T.)} = \frac{\text{Segnale fotoni prodotti da cellule trattate con i monomeri (2 h)}}{\text{Segnale fotoni prodotti da cellule di controllo (2 h)}} \times 100$$

Analisi statistica

Tutti i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). I gruppi di medie sono stati comparati tramite analisi della varianza (ANOVA) seguita, quando necessario, da una comparazione multipla delle medie mediante saggio di Student-Newman-Keulz. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

Nessun effetto citotossico è stato riscontrato nelle condizioni sperimentali adottate (risultati non riportati).

Effetti dei monomeri metilacrilici sui granulociti polimorfonucleati

Mentre il DUDMA ed il Bis-GMA indu-

cono una significativa diminuzione della produzione di ROS sia in condizioni basali che in presenza di stimoli antigenici, il BDDMA inibisce la produzione basale di ROS senza alcun effetto

sulla produzione sotto stimolo antigenico (Figg. 4 e 5).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro dimostrano che i monomeri DUDMA e Bis-GMA provocano una significativa diminuzione sia del *burst* ossidativo che della produzione basale di radicali nei PMN. Tale fenomeno deve essere attribuito solo ad una alterazione funzionale, poiché l'analisi della vitalità cellulare dimostra che le concentrazioni utilizzate non inducono mortalità cellulare nelle condizioni sperimentali utilizzate. L'approfondimento di questo effetto risulta interessante data l'importanza che i PMN rivestono nella resistenza

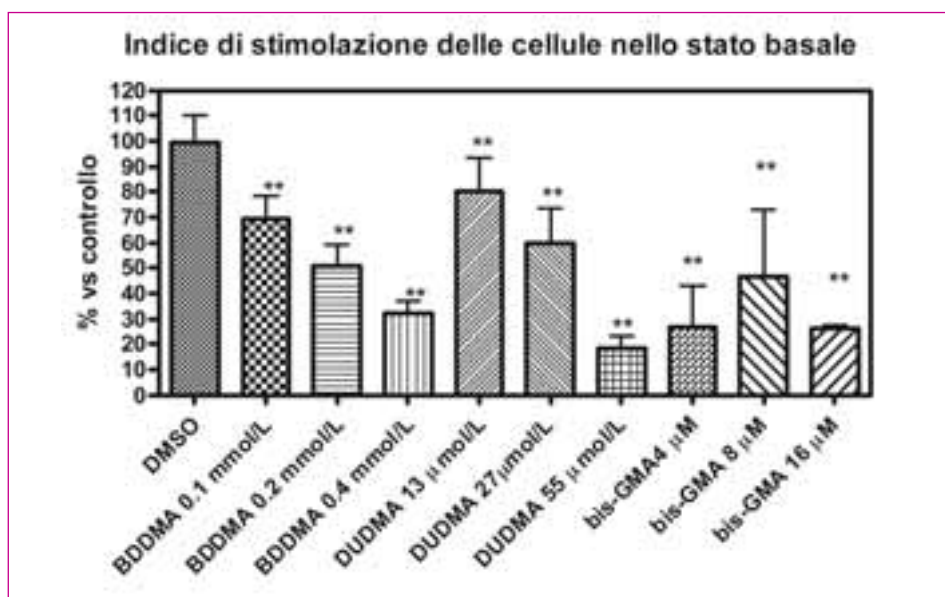


Fig. 4 - Indice di stimolazione dei PMN non stimolati in presenza ed in assenza dei monomeri.

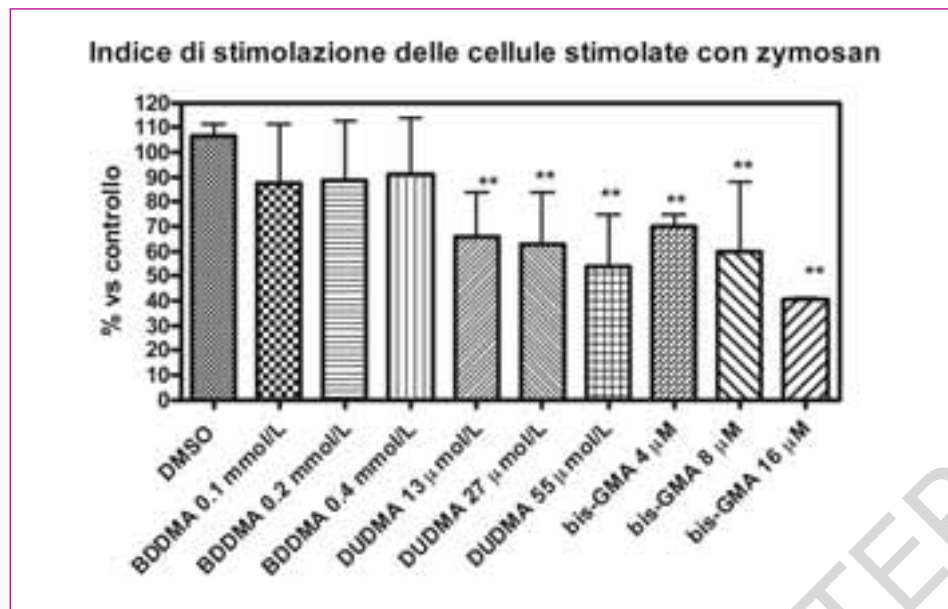


Fig. 5 - Indice di stimolazione dei PMN stimolati con zymosan opsonizzato in presenza ed in assenza dei monomeri.

dell'organismo verso gli agenti patogeni. Questo risultato, inoltre, evidenzia la necessità di non limitare i saggi di biocompatibilità alla sola valutazione della citotossicità perchè ciò non permette di valutare adeguatamente le interazioni funzionali tra cellule e materiali dentali.

Le cellule trattate con BDDMA non subiscono invece variazioni del *burst* ossidativo mentre mostrano una riduzione statisticamente significativa della produzione basale di ROS: il risultato ottenuto sembra quindi indicare che tale composto potrebbe essere in grado di stabilizzare i PMN nello stato quiescente, lasciando inalterata la loro capacità di rispondere agli stimoli antigenici. L'effetto descritto è molto interessante a causa del coinvolgimento dei PMN in patologie infiammatorie sia gravi che moderate, sebbene la sua effettiva rilevanza clinica debba ancora essere valutata.

BIBLIOGRAFIA

- Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994; 22 Suppl 2:S6-11.
- Calheiros FC, Kawano Y, Stansbury JW, Braga RR. Influence of radiant exposure on contraction stress, degree of conversion and mechanical properties of resin composites. *Dent Mater* 2006; 22:799-803.
- Lohbauer U, Rahiotis C, Kramer N, Petschelt A, Eliades G. The effect of different light-curing units on fatigue behavior and degree of conversion of a resin composite. *Dent Mater* 2005; 21(7):608-15.
- Hensten-Pettersen A. Skin and mucosal reactions associated with dental materials. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 (2 Pt 2):707-12.
- Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 1998; 106(2 Pt 2):696-706.
- Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:333-55.
- Leinfelder KF. Current status of dentin adhesive systems. *Alpha Omegan* 1998; 91: 17-22.
- Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 1984; 5:5-10.
- Lefebvre CA, Wataha JC, Bouillaguet S, Lockwood PE. Effects of long-term sublethal concentrations of dental monomers on THP-1 human monocytes. *J Biomater Sci Polymer Ed* 1999; 10: 1265-1274.
- Heil TL, Volkmann KR, Wataha JC, Lockwood PE. Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. *J Oral Rehab.* 2002; 29: 401-407.
- Nocca G, De Sole P, Gambarini G, e Coll. Alteration of monocytic cell oxidative burst caused by methacrylic monomers present in dental materials: a chemiluminescence study. *Luminescence* 2006; 21: 202-206.
- Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod* 1999; 25: 114-117.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93:1464-70.
- Henson PM, Johnston RB Jr. Tissue injury in inflammation: oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin. Invest.* 1987; 79 :669-673.
- Silliman CC. Transfusion-related acute lung injury. *Transfus. Med Rev.* 1999; 13: 177-186.
- Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK,. Transfusion-related acute lung injury *Blood* 2005; 105: 2266-2273.
- Sheppard FR, Keheler MR, Moore EE, e coll. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc. Biol.* 2005; 78: 1025-1042.
- Botha AJ, Moore FA, Moore EE, e coll. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma* 1995; 39: 411-417.
- Thonemann B, Schmalz G, Hiller K-A, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental materials* 2002; 18: 318-323.
- Nocca G, De Palma F, Minucci A, e coll. Alterations of energy metabolism and glutathione levels of HL-60 cells induced by methacrylates present in composite resins. *J Dent* 2007; 35 (3) : 187-94.
- De Sole P, Lippa S, Littarru GP. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to assess oxygen dependent microbicidal activity of granulocytes. *J Clin Labor Automation* 1983; 3: 391- 400.