

Gianrico Spagnuolo*
Vincenzo D'Antò
Roberto Uomo
Maria Patrizia Di Caprio
Sandro Rengo

Università degli Studi di Napoli
"Federico II"
Dipartimento di Scienze
Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali
Cattedra di Odontoiatria Conservatrice

Corrispondenza:
Dott. Gianrico Spagnuolo
Via Pansini, 5
80131 Napoli
Tel. e Fax: 081 7462080
E-mail: gspagnuo@unina.it

Pervenuto in Redazione il 13 dicembre 2006
Accettato per la pubblicazione l'8 febbraio 2007

NF- κ B modula la produzione di ROS e la citotossicità causata da TEGDMA ed HEMA nelle cellule pulpari umane

Modulation of ROS production induced by TEGDMA and HEMA in HPC

RIASSUNTO

Scopo: studi precedenti hanno stabilito che il 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) ed il triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA) possono determinare stress cellulare attraverso la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) è un fattore di trascrizione sensibile all'equilibrio ossido-riduttivo capace di regolare l'espressione di proteine anti-apoptotiche così come l'accumulo dei ROS. In questo studio abbiamo testato l'ipotesi che l'attivazione del *pathway* di NF- κ B da parte del HEMA e del TEGDMA induce una protezione contro la loro citotossicità attraverso la diminuzione della produzione dei ROS.

Metodologia: Human Pulp Cells (HPC) e Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), *wild type* e *p65 knock-out* (*p65*^{-/-}), sono state trattate con TEGDMA ed HEMA in tutti gli esperimenti. L'effetto dei monomeri sull'attività metabolica cellulare e quindi sulla vitalità veniva valutato con il test del MTT (attività delle deidrogenasi mitocondriali). La produzione di ROS influenzata dai monomeri veniva quantificata con citometria a flusso tramite l'utilizzo di Diclorofluoresceina (DCFH-DA). L'attivazione del *pathway* di NF- κ B era valutata tramite *western blotting*.

Risultati: in tutte le linee cellulari i monomeri inducevano morte cellulare, riduzione dell'attività mitocondriale e aumento dei livelli di ROS in maniera do-

se-dipendente. Inoltre, il TEGDMA attivava NF- κ B nelle HPC; le cellule *p65*^{-/-} mostravano un più alto aumento dei livelli di ROS e di morte cellulare rispetto alla MEF.

Conclusioni: questi risultati suggerivano che HEMA e TEGDMA inducevano morte cellulare attraverso l'aumento dei livelli di ROS e che la protezione di NF- κ B contro la tossicità di questi due monomeri poteva essere mediata attraverso una soppressione dei livelli di ROS.

Parole chiave:
Monomeri dentari, ROS, NF- κ B.

ABSTRACT

Aim: previous investigations have established that 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) are a likely cause of cellular stress via the formation of reactive oxygen species (ROS). Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a redox-sensitive transcription factors able to regulate the expression of anti-apoptotic proteins as well as the accumulation of ROS. In the present study we tested the hypothesis that the activation of NF- κ B pathway by TEGDMA and HEMA induces a protection against their cytotoxicity via decreasing ROS production.

Methodology: Human Pulp Fibroblasts (HPC) and mouse embryonic fibroblasts (MEF), *wild type* and/or *p65 knock-out* (*p65*^{-/-}), were treated by TEGDMA

and HEMA. MTT were used to evaluate cell viability. Reactive oxidative species (ROS) levels were measured by flow cytometry by using DCFH-DA. NF- κ B activation were assessed by western blotting.

Results: in all cell lines monomers induced cell death, reduction of mitochondrial activity and an increase of ROS levels in dose dependent manner. Moreover TEGDMA activated NF- κ B in HPC. *p65*^{-/-} cells showed higher increase of ROS levels and cell death related to MEF.

Conclusion: this results suggested that HEMA and TEGDMA induced cell death by increased ROS levels and that NF- κ B protection against these monomers could be mediated through a suppression of the formation of ROS.

Key words:
Dental Monomers, ROS, NF- κ B.

INTRODUZIONE

Il 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) ed il triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA) sono comunemente conosciuti come monomeri rilasciabili dai materiali resinosi (1). Studi precedenti hanno dimostrato una varietà di potenziali effetti citotossici e metabolici conseguenti al rilascio di queste sostanze dai restauri e dagli adesivi dentali (2). Recenti indagini hanno fatto grandi sforzi per chiarificare i meccanismi mo-

lecolari che sono alla base della citotossicità dei monomeri dentari (3).

In generale, il danno e la sopravvivenza cellulare sono regolati da diversi fattori, tra cui il bilancio tra la produzione di ROS ed i sistemi antiossidanti. È stato dimostrato, in diverse linee cellulari, che HEMA e TEGDMA sono una probabile causa di stress cellulare attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (4-7). Un'eccessiva produzione di ROS non contrastata dai normali sistemi antiossidanti intracellulari può causare danno alle strutture cellulari (lipidi e proteine) o al DNA (3). Differenti stimoli usano i ROS come messaggeri nella segnalazione per l'attivazione di fattori di trascrizione sensibili all'equilibrio ossido-riduttivo come Nrf2, AP-1 e il Nuclear Factor kappa B (NF-kB) (8).

NF-kB regola l'espressione di proteine antiapoptotiche (c-IAP-1/2, XIAP, Bcl-2 e Bcl-XL) e regolatori del ciclo cellulare, influenzando così sia la sopravvivenza cellulare che la proliferazione (9). Inoltre, è stato mostrato che l'attivazione di NF-kB può prevenire lo stress ossidativo apoptotico attraverso l'aumento dei livelli di tioredoxina e di MnSOD, riducendo quindi l'accumulo di ROS (9). Poiché in un precedente studio abbiamo dimostrato che NF-kB gioca un ruolo protettivo nel contrastare la citotossicità del HEMA (10), gli obiettivi dell'attuale studio sono: 1) valutare se il TEGDMA attiva il *pathway* di NF-kB nelle HPC; 2) scoprire se NF-kB gioca il suo ruolo protettivo modulando i ROS indotti dall'HEMA e dal TEGDMA. Quindi, nel presente studio, viene testata l'ipotesi che l'attivazione del *pathway* di NF-kB da parte di HEMA e TEGDMA induce una protezione contro la loro citotossicità attraverso il decremento dei ROS.

MATERIALI E METODI

Culture cellulari

Fibroblasti umani pulpari (HPC) sono stati ottenuti da terzi molari di pazienti giovani e sani, previo consenso informato. Per gli esperimenti sono state utilizzate HPC tra il 2 ed il 6 passaggio.

Mouse Embryonic Fibroblasts erano derivati da topi *wilde type* (MEF) e da topi p65 *knock out* (p65^{-/-}). Le cellule p65^{-/-} erano cellule che, mancando della subunità p65, non hanno NF-kB attivo. Tutte le linee cellulari erano cresciute in *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM) con 10% di siero bovino fetale (FCS), 2 mM glutammina, 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomina. I mezzi e i reagenti sono stati acquistati dalla InVitrogen (Italia).

Attività delle deidrogenasi mitocondriali

Come precedentemente descritto (5), il saggio dell'MTT è usato per valutare l'attività delle deidrogenasi mitocondriali e quindi la vitalità cellulare. Le HPC venivano piastrate in una *multiwell* da 96 pozzetti e dopo 24h il mezzo veniva rimosso e le cellule venivano esposte a varie concentrazioni di monomeri per altre 24h. Al termine della stimolazione in ogni pozzetto veniva aggiunta la soluzione di MTT (Sigma, Italia). Dopo 1h, la densità ottica veniva misurata con un lettore di piastre (TECAN, Austria) alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Misurazione dei livelli di ROS intracellulari

Per misurare l'effetto del HEMA e del TEGDMA sull'induzione di specie reattive dell'ossigeno, le cellule sono state incubate con differenti concentrazioni di monomeri e poi marcate con 10 μ M DCFH-DA per 30 min a 37°C. I cambiamenti nei livelli dei ROS sono stati valutati ed analizzati attraverso citometria a flusso (FacScan, BD, Usa) a differenti tempi di stimolazione.

Attivazione di NF-kB

Per valutare l'attivazione del *pathway* di NF-kB da parte del TEGDMA, le HPC sono state trattate con il monomero per 30, 60 e 120 min, ed abbiamo monitorato, tramite *Western Blotting*, i livelli della subunità inibitoria I κ B α , come precedentemente descritto (10).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata attraverso ANOVA seguito dal test di Tukey per la comparazione multipla dei campioni. È stato considerato significativo il valore di $P < 0.05$.

RISULTATI

Dopo 24 h, TEGDMA ed HEMA inducivano una riduzione dell'attività mitocondriale delle cellule pulpari in maniera dose-dipendente. 3mM TEGDMA e 10 mM HEMA diminuivano l'attività mitocondriale di circa 50% (Fig. 1A, B). I monomeri usati aumentavano significativamente i livelli dei ROS nelle HPC rispetto al controllo non trattato (Fig. 2). I livelli di I κ B α nelle cellule lisate diminuivano 60 e 120 min dopo l'esposizione delle HPC al TEGDMA (Fig. 3). Per valutare se NF-kB modula l'aumento dei livelli di ROS causato dai monomeri, abbiamo trattato le cellule MEF e p65 *knock out* (p65^{-/-}) con HEMA e TEGDMA. Le cellule p65^{-/-} mostravano una riduzione significativa dell'attività della deidrogenasi mitocondriale e quindi della vitalità cellulare quando

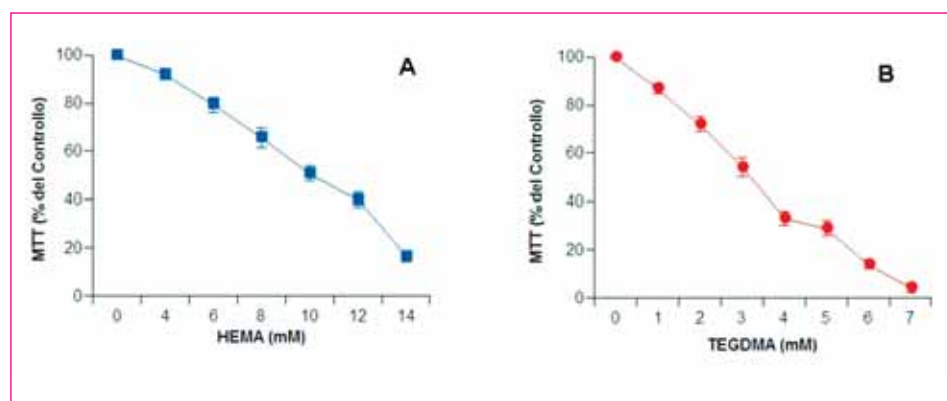


Fig. 1 - Effetto del HEMA (A) e del TEGDMA (B) sulla vitalità delle cellule pulpari umane (HPC) valutata tramite il test del MTT.

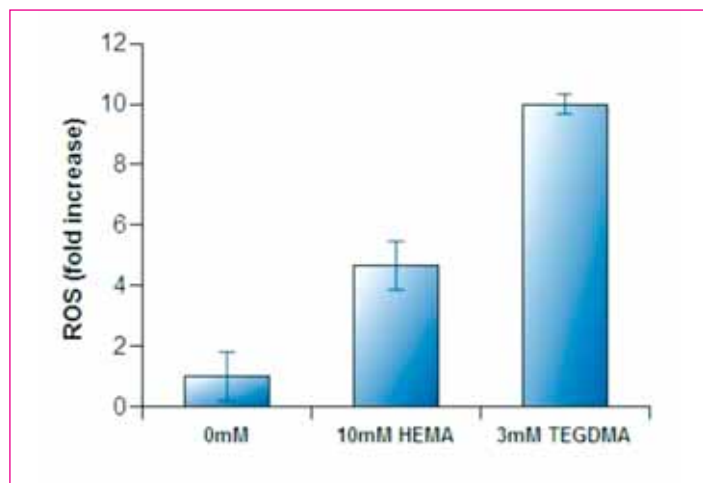


Fig. 2 - Produzione dei ROS indotta da HEMA e TEGDMA nelle cellule pulpari umane.



Fig. 3 - Attivazione del pathway di NF- κ B da parte del TEGDMA. Degradazione della subunità inibitoria Ikba nelle HPC esposte a differenti concentrazioni di TEGDMA.

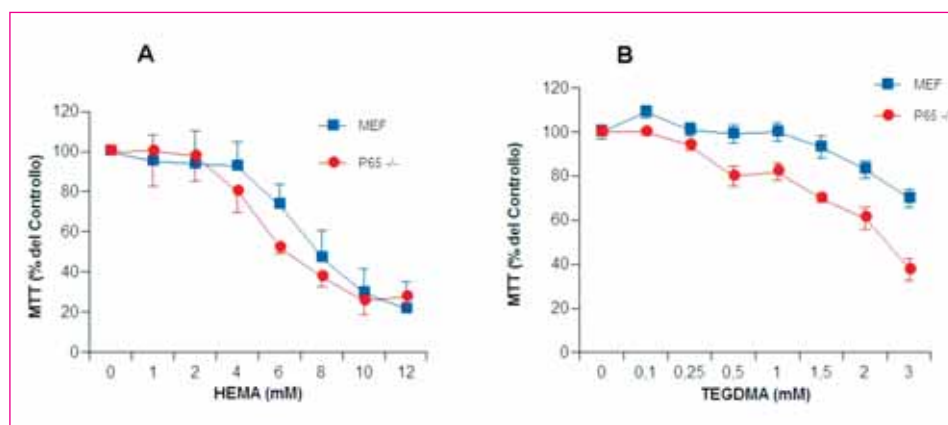


Fig. 4 - Effetto del HEMA (A) e del TEGDMA (B) sulla vitalità delle MEF wilde type vs. p65^{-/-}. P65^{-/-} mostrano una riduzione significativa dell'attività mitocondriale.

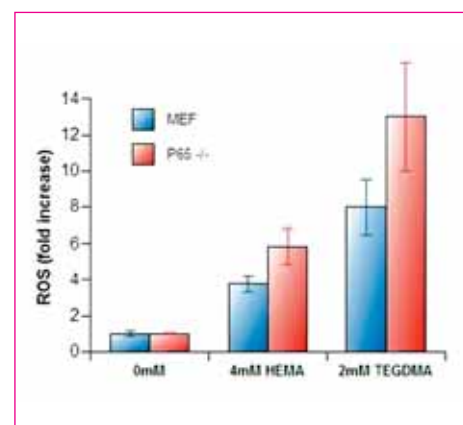


Fig. 5 - Induzione dei ROS nelle MEF e P65^{-/-} stimulate con HEMA e TEGDMA.

esposti a TEGDMA ed HEMA comparate alle MEF (Fig. 4 A, B). Inoltre, entrambi i monomeri inducono un significativo aumento dei livelli di ROS che risultava più evidente nelle cellule p65^{-/-} rispetto alle MEF (Fig. 5).

DISCUSSIONE

I nostri risultati dimostravano che l'esposizione di cellule pulpari al TEGDMA e al HEMA causava un aumento dose-dipendente dei livelli di ROS ed una riduzione della vitalità cellulare. Questi risultati erano in linea con quanto visto

in numerosi precedenti studi (3). In generale, livelli sostenuti di ROS possono portare alla necrosi e/o all'apoptosi non solo attraverso un severo danno a carico del DNA, dei lipidi di membrana e delle proteine, ma anche attivando *pathway* di segnalazione di stress intracellulare. Alcuni di questi *pathway* sono chiaramente legati all'aumento della sopravvivenza, mentre altri sono associati con la morte cellulare ed altri ancora possono produrre effetti dipendenti dalle circostanze. Molti studi evidenziano il ruolo protettivo di NF- κ B seguente al danno ossidativo, mentre altre ricerche supportano la nozione che NF- κ B abbia un ruolo pro-apoptotico. Infatti, il ruolo di NF- κ B nella risposta

cellulare al danno può dipendere dalla noxa e dal tipo cellulare (11). L'inibizione della morte cellulare da parte di NF- κ B sembra essere determinata da un'attenuazione della cascata di c-Jun N-terminal kinase (JNK) attraverso l'induzione di *downstream target*. Un concetto molto interessante e di recente acquisizione indica che NF- κ B può svolgere il suo ruolo protettivo grazie ad una attenuazione dell'accumulo dei ROS intracellulari. Attualmente l'attività antiossidante di NF- κ B sembra essere legata ad una *upregulation* sia della catena pesante della ferritina che di MnSOD (9). Nel nostro studio abbiamo dimostrato che sia il TEGDMA che HEMA inducono una riduzione della vitalità cellulare in ma-

niera maggiore nelle cellule p65 -/- rispetto alle MEF. Questo risultato suggeriva che NF- κ B può avere un ruolo protettivo nella risposta alla morte cellulare indotta sia da HEMA che da TEGDMA. Inoltre, per entrambi i monomeri, le p65 -/- mostravano un maggiore aumento dei livelli di ROS rispetto alle MEF. Questi risultati confermano che HEMA e TEGDMA causano morte cellulare correlata ad

un aumento dei livelli di ROS e, più interessante, suggeriscono che la protezione di NF- κ B contro questi monomeri può essere legata alla capacità di NF- κ B di ridurre l'accumulo di ROS intracellulari.

In conclusione, poiché è stato ampiamente dimostrato che i monomeri dentari possono diffondere attraverso la dentina in concentrazioni tali da esercitare effetti tossici sul tessuto pulpare,

risulta chiaro che l'identificazione dei maggiori *pathway* coinvolti nella morte e sopravvivenza cellulare ha una importante rilevanza clinica. Quindi, i monomeri resinosi capaci di attivare *pathway* intracellulari, anche se a basse concentrazioni, possono influenzare una varietà di funzioni della normale omeostasi tissutale del complesso pulpo-dentinale.

BIBLIOGRAFIA

1. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:333-355.
2. Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:47-60.
3. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006;85:870-877.
4. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater* 2006 - in press.
5. Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2006;27(9):1803-9.
6. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, 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(7):745-53.
7. 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(2):272-6.
8. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006;72(11):1493-505.
9. Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR, Dean K, Franzoso G. The NF- κ B-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* 2006;13:712-29.
10. Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paternò R, Schweikl H, Avvedimento EV, Rengo S. NF- κ B protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 2004;83:837-842.
11. Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3:221-227.