

Giuseppina Nocca¹
Bruno Giardina^{1,2}
Alessandro Lupi²
Claudio Chimenti³

Università Cattolica del S. Cuore, Roma
Facoltà di Medicina e Chirurgia
¹ Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica
Direttore: Prof. Bruno Giardina
CNR, Sezione di Roma
² Istituto di Chimica del
Riconoscimento Molecolare
Direttore: Prof. Bruno Giardina
Università degli Studi di L'Aquila, L'Aquila
³ Dipartimento di Scienze Chirurgiche
Direttore: Prof. Mario Giannoni

Corrispondenza:
Dott.ssa Giuseppina Nocca
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica
Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università Cattolica del S. Cuore
L.go Francesco Vito, 1 - 00168 Roma
Tel 06 3057612 - Fax 06 3053598
E-mail: giuseppina.nocca@icrm.cnr.it

Pervenuto in Redazione il 30 novembre 2004
Accettato per la pubblicazione l'8 gennaio 2005

Una nuova metodica di valutazione biologica di materiali endodontici a base di monomeri metilacrilici

A new method for biological evaluation of resin-based endodontic materials

RIASSUNTO

Scopo: di recente sono stati introdotti per l'uso endodontico cementi resinosi per l'otturazione canalare che contengono composti metilacrilici, con polimerizzazione di tipo duale. Questa reazione però non è mai completa e ciò comporta il rischio di rilascio nei tessuti periapicali di monomeri che potrebbero interferire con i meccanismi di riparazione delle ferite pulpo-periapicali, tra i quali il sistema monociti-macrofagi. Tali interazioni sono state oggetto di valutazioni sperimentali *in vitro* nel presente studio.

Metodologia: con il presente lavoro si è voluto valutare il grado di attività funzionale del sistema monocito-macrofagico dopo esperimenti di incubazione con diversi monomeri, tra quelli comunemente usati in odontoiatria, e nei cementi resinosi per uso endodontico. L'analisi del *burst* ossidativo della linea cellulare differenziata THP-1 è stato analizzato usando la tecnica della chemiluminescenza. I dati sono stati raccolti ed analizzati statisticamente.

Risultati: i risultati ottenuti rivelano una riduzione della funzionalità cellulare in presenza dei monomeri, indipendente dalla loro azione citotossica o dall'esaurimento del glutazione.

Conclusioni: dati emersi dal presente studio aprono la strada per future indagini quali: la determinazione dei valori di concentrazione dei monomeri che possono determinare *in vivo* gli stessi fenomeni osservati *in vitro*, la valutazione degli effetti clinici dell'alterazione del *burst* ossidativo sulla funzionalità dei monociti-macrofagi e dell'importanza dell'analisi funzionale negli studi preliminari di biocompatibilità dei materiali dentali.

Parole chiave:

Monomeri- monociti, macrofagi, *burst* ossidativo, chemiluminescenza.

ABSTRACT

Aim: new dual-cure resin-based root canal filling materials have recently been developed. These materials contain methacrylic compounds. In clinical practice these compounds are polymerised, but chemical reaction is never complete. As a consequence, release of uncured monomers in the periapical tissues and in biological fluids may happen, and potentially alter repair of pulpal and periapical lesions. The aim of this work was the evaluation of the *in vitro* potential risk of such release on periapical cells.

Methodology: functional activity of monocyte-macrophages system after incubation with monomers was assessed. Oxidative burst analysis of peripheral blood monocytes and of differentiated THP-1 cell line was analyzed using the chemiluminescence technique. Data were collected and statistically analyzed.

Results: results showed a reduced cellular functionality in presence of the monomers, independently from their cytotoxic action or from glutathione depletion.

Conclusions: these findings demand for future evaluation of the clinical effects of oxidative burst alteration in monocytes-macrophages function and may lead to including functional analysis in biocompatibility preliminary studies of endodontic materials.

Key words:

Monomers- monocytes, macrophages, oxidative burst, chemiluminescence.

INTRODUZIONE

Monomeri metilacrilici quali il 2-idrossietil-metilacrilato (HEMA), il trietileneglicol-dimetilacrilato (TEGDMA) ed il bis-fenolo-A-glicerolato (1 glicerolo/fenolo)-dimetilacrilato (Bis-GMA) sono largamente presenti nei materiali per odontoiatria restaurativa, e di recente hanno trovato largo sviluppo anche nei nuovi sistemi di otturazione endodontica, sia come cementi da utilizzare con guttaperca sia come componenti di sistemi con materiali di sintesi (ad esempio, Resilon) volti a sostituire la guttaperca.

In questi ultimi casi, infatti, l'obiettivo è di realizzare un'intima unione chimica e/o meccanica fra cemento-materiale d'otturazione semisolido e pareti canalari, per un miglioramento del sigillo, sia apicale che coronale. Per ottenere ciò si sono ideati nuovi materiali per sfruttare il concetto dell'endodonzia adesiva, secondo le indicazioni sviluppate dalle esperienze sull'adesione in altri settori dell'odontoiatria: sono stati sviluppati nuovi cementi di tipo composito, utilizzando i monomeri comunemente usati per i materiali da restauro, a polimerizzazione duale, in combinazione con *primer* e materiali sintetici semisolidi.

La polimerizzazione chimica o fotochimica dei monomeri precedentemente citati genera una struttura reticolata ma il grado di conversione non supera - anche nei casi migliori - valori del 75-80% (1); questa trasformazione incompleta comporta - nelle situazioni della clinica odontoiatrica - il rilascio di monomeri nella cavità orale e nei fluidi biologici (2). Pertanto nel caso dei cementi endodontici tale rilascio può avvenire nei tessuti periapicali ed interferire con i meccanismi di riparazione delle ferite pulpari e periapicali.

Precedenti studi hanno infatti suggerito una possibile interazione tra i composti rilasciati ed il sistema dei monociti-macrofagi (3, 9, 10, 23), determinabile attraverso l'analisi dell'interleukina-1 β e del TNF- α due mediatori dell'infiammazione prodotti dai macrofagi (27); questi ultimi rivestono un ruolo centrale nel processo di guarigione delle ferite, coordinando la riparazione tissutale attraverso la produzione di un'ampia gamma di fattori che influenzano l'angiogenesi e la sintesi della matrice extracellulare.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare la funzionalità del sistema monocito-macrofagico dopo trattamento con differenti concentrazioni di HEMA, TEGDMA, Bis-GMA oppure idrochinone monometiletero (HQ), quest'ultimo presente come stabilizzatore nelle preparazioni commerciali dei monomeri. A tale scopo, è stata utilizzata la linea cellulare tumorale umana THP-1 differenziata in senso monocitario con acido retinoico tutto-*trans* (ATRA) ed è stato analizzato il *burst* ossidativo attraverso la tecnica della chemiluminescenza (CL); questa analisi permette una determinazione quantitativa delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dalle cellule, un parametro di notevole importanza anche perché è stato recentemente stabilito che il perossido di idrogeno, prodotto dal *burst* ossidativo, rappresenta un secondo messaggero coinvolto nel percorso di attivazione dei geni deputati alla produzione di interleuchine (32, 33). L'accurata valutazione del *burst* ossidativo può quindi aiutare a comprendere meglio lo stato funzionale del sistema monocito-macrofagico.

Gli effetti dell'idrochinone monometiletero sono stati analizzati separatamente poiché questa molecola è sempre presente - come precedentemente indicato - nelle confezioni dei monomeri.

Nello studio di biocompatibilità di un materiale contenente metilacrilati è importante stabilire non soltanto la citotossicità, ma tutte le interazioni tra cellule e monomeri per comprendere meglio il comportamento del materiale stesso e per questo motivo la valutazione funzionale del sistema dei monociti-macrofagi può rivestire un ampio interesse.

MATERIALI E METODI

I valori di concentrazione dei monomeri sono stati scelti in base a quelli delle rispettive TC₅₀ (dose che provoca il 50% di morta-

rità), precedentemente calcolate con l'uso del saggio MTT sulla linea cellulare THP-1 [23], anche se con tempi diversi (24 h) rispetto a quelli utilizzati in questo lavoro (1 h).

Materiali e reagenti

Quando non altrimenti indicato, tutti i prodotti chimici ed i reagenti (grado di purezza per colture cellulari) sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich Srl, Milano.

Culture cellulari

Monociti umani della linea cellulare THP-1 (Istituto Zooprofilattico di Brescia) sono stati mantenuti a 37 °C sotto atmosfera umidificata di CO₂ al 5% nel terreno RPMI 1640, con siero fetale di vitello inattivato col calore (10%, v/v), β -mercaptoetanolo (50 mmol/L), penicillina (100 unità/mL), streptomicina (100 mg/mL) e glutammina (2 mmol/L).

Vitalità cellulare

Il numero di cellule è stato determinato utilizzando il saggio di esclusione del colorante trypan blue.

Trattamento con acido retinoico tutto-*trans*

Cellule THP-1 in crescita esponenziale (2 x 10⁵ cellule/mL) sono state poste nel terreno RPMI 1640 contenente ATRA (1 x 10⁻³ mmol/L), per 5 giorni. Precedentemente è stata preparata una soluzione madre di ATRA (1 mmol/L) in dimetilsolfossido (DMSO), in modo da ottenere una concentrazione 0.1 % di quest'ultimo nella coltura cellulare.

Trattamento dei monomeri

Soluzioni in DMSO di TEGDMA (a concentrazioni crescenti da 0.0031 mol/L a 4.65 mol/L), di Bis-GMA (a concentrazioni crescenti da 8.00 mmol/L a 120.00 mmol/L) e di HQ (ad una concentrazione di 0.11 mmol/L) sono state preparate immediatamente prima dell'uso; come procedimento generale 1 μ L di una delle soluzioni precedentemente descritte è stato aggiunto a 1 mL di terreno RPMI 1640 contenente 400.000 cellule THP-1 differenziate con ATRA e l'incubazione è stata effettuata a temperatura ambiente (TA) per 1 h. La concentrazione finale di DMSO è stata pari a 0.1% (v/v) in tutti i campioni durante gli esperimenti; il monomero HEMA è stato invece aggiunto puro ad aliquote di terreno RPMI 1640, per ottenere valori di concentrazioni finali nell'intervallo da 1.10 mmol/L a 20.00 mmol/L. Dopo l'incubazione, le cellule THP-1 sono state centrifugate per rimuovere il sovrantan-

te, lavate con PBS, raccolte e contate utilizzando il metodo del colorante trypan blue. I monociti isolati sono stati incubati con:

a) TEGDMA (a concentrazioni crescenti da 0.0031 mmol/L a 3.1 mmol/L); b) Bis-GMA (a concentrazioni crescenti da 0.008 mmol/L a 0.080 mmol/L); c) HEMA (a concentrazioni di 1.1 mmol/L e 11 mmol/L).

Ciascuna incubazione è stata effettuata per 1 h a TA.

Saggi funzionali

Il metabolismo delle ROS della linea cellulare THP-1 è stato studiato attraverso la tecnica della chemiluminescenza secondo De Baeselier *et al.* (25); i sistemi CL erano costituiti da luminolo o lucigenina (100 nmoli), 1 x 10⁵ cellule THP-1 trattate con ATRA o non trattate (queste ultime utilizzate come controllo), in presenza oppure in assenza di forbole 12-miristato-13-acetato (PMA, 1.50 nmoli) in un volume finale di 1.00 mL ottenuto con una soluzione modificata di Krebs Ringer Fosfato (KRP).

Le misure sono state effettuate in triplicato a 25 °C ed il parametro di chemiluminescenza considerato per l'analisi è stato l'indice di trattamento (IT) seguente:

$$\frac{\text{Segnale dei fotoni (area) prodotto dalle cellule trattate}}{\text{Segnale dei fotoni (area) prodotto dalle cellule non trattate}} \times 100$$

In una differente serie di tre esperimenti, realizzati in triplicato, le cellule differenziate THP-1 (400.000 cellule/mL) sono state incubate a TA per 1 h, rispettivamente, in presenza ed in assenza di una soluzione di N-acetilcisteina (10 mmol/L, NAC), cui ha fatto seguito un'incubazione per 1 h a TA con:

- TEGDMA 1.55 mmol/L;
- Bis-GMA 0.08 mmol/L;
- HEMA 6.00 mmol/L.

Dopo l'esposizione le cellule sono state lavate con PBS, contate utilizzando il metodo del colorante trypan blue e quindi processate per l'analisi di chemiluminescenza.

Attività dell'enzima perossidasi

L'attività dell'enzima perossidasi delle cellule THP-1 trattate con i monomeri è stata verificata con uno strumento Technicon H*1 Hematology Analyzer (Bayer Instrument Corp, Torreytown, NY).

Effetto citotossico

È stata effettuata un'ulteriore serie di tre

esperimenti, realizzati in triplicato, per verificare l'effetto citotossico dei monomeri nel medio periodo; a tale scopo cellule THP-1 (200.000 cellule/mL) sono state incubate, a TA per 1 h, con:

- TEGDMA (a concentrazioni crescenti da 0.775 mmol/L a 4.65 mmol/L);
- Bis-GMA (a concentrazioni crescenti da 0.04 mmol/L a 0.12 mmol/L);
- HEMA (a concentrazioni crescenti da 1.1 mmol/L a 20 mmol/L).

Dopo l'esposizione le cellule THP-1 sono state lavate con PBS, depositate in una nuova fiasca e lasciate per 5 giorni, effettuando conte giornaliere con il saggio di esclusione del trypan blue.

Analisi statistica

Tutti i risultati sono espressi come media \pm SD o media \pm SEM. I gruppi di medie sono stati comparati attraverso analisi della varianza (ANOVA) seguita, quando opportuno, da una comparazione multipla di medie con il metodo Student-Newman-Keulz. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

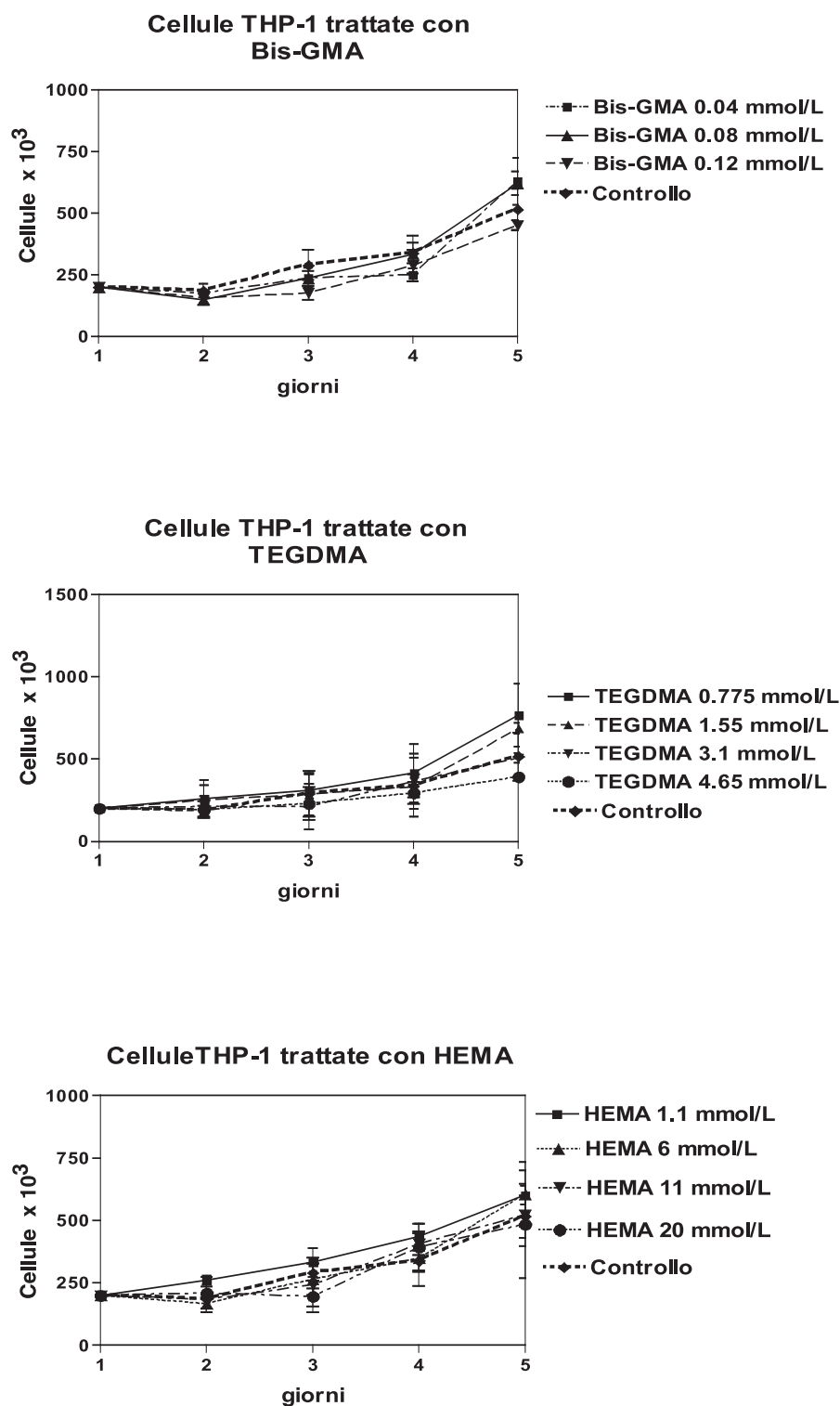
Vitalità cellulare

Non sono stati osservati effetti citotossici - con il saggio di esclusione del colorante trypan blue - dopo il contatto tra cellule e monomeri, sia immediatamente che nei 5 giorni successivi (Tab.1).

Analisi funzionale di chemiluminescenza con la sonda lucigenina

Tutti i monomeri analizzati si sono dimostrati in grado di ridurre - a differenti valori di concentrazione - l'attività della NADPH-ossidasi delle cellule trattate con ATRA.

Una soluzione a concentrazione 80 μ mol/L di Bis-GMA causa una significativa riduzione del *burst* ossidativo delle cellule THP-1 (circa 50%, $p < 0.01$), ed una diminuzione ancora maggiore (75%, $p < 0.001$) è stata osservata con una soluzione a concentrazione 120 μ mol/L. Quando le cellule sono trattate con una soluzione 1.55 mmol/L di TEGDMA, si osserva una riduzione dell'attività della NADPH-ossidasi pari a circa il 30% ($p < 0.01$), mentre in presenza di valori di concentrazione di monomero più alti (3.10 mmol/L e 4.65 mmol/L rispettivamente) il *burst* ossidativo diminuisce di circa il 50% ($p < 0.001$). La riduzione del *burst* ossidativo causata dal monomero HEMA è statisticamente signifi-



Tab. 1 - Il test di tossicità su cellule THP-1 dei diversi monomeri alle varie concentrazioni esaminate non mostra effetti tossici.

cativa ad un valore di concentrazione pari a 6 mmol/L ($p < 0.01$) e valori più alti (11 mmol/L e 20 mmol/L) provocano una riduzione di circa il 50% ($p < 0.001$) (Tab. 2). Tutti gli effetti sopradescritti permangono anche in presenza di NAC a concentrazione 10 mmol/L.

Analisi funzionale di chemiluminescenza con la sonda luminolo

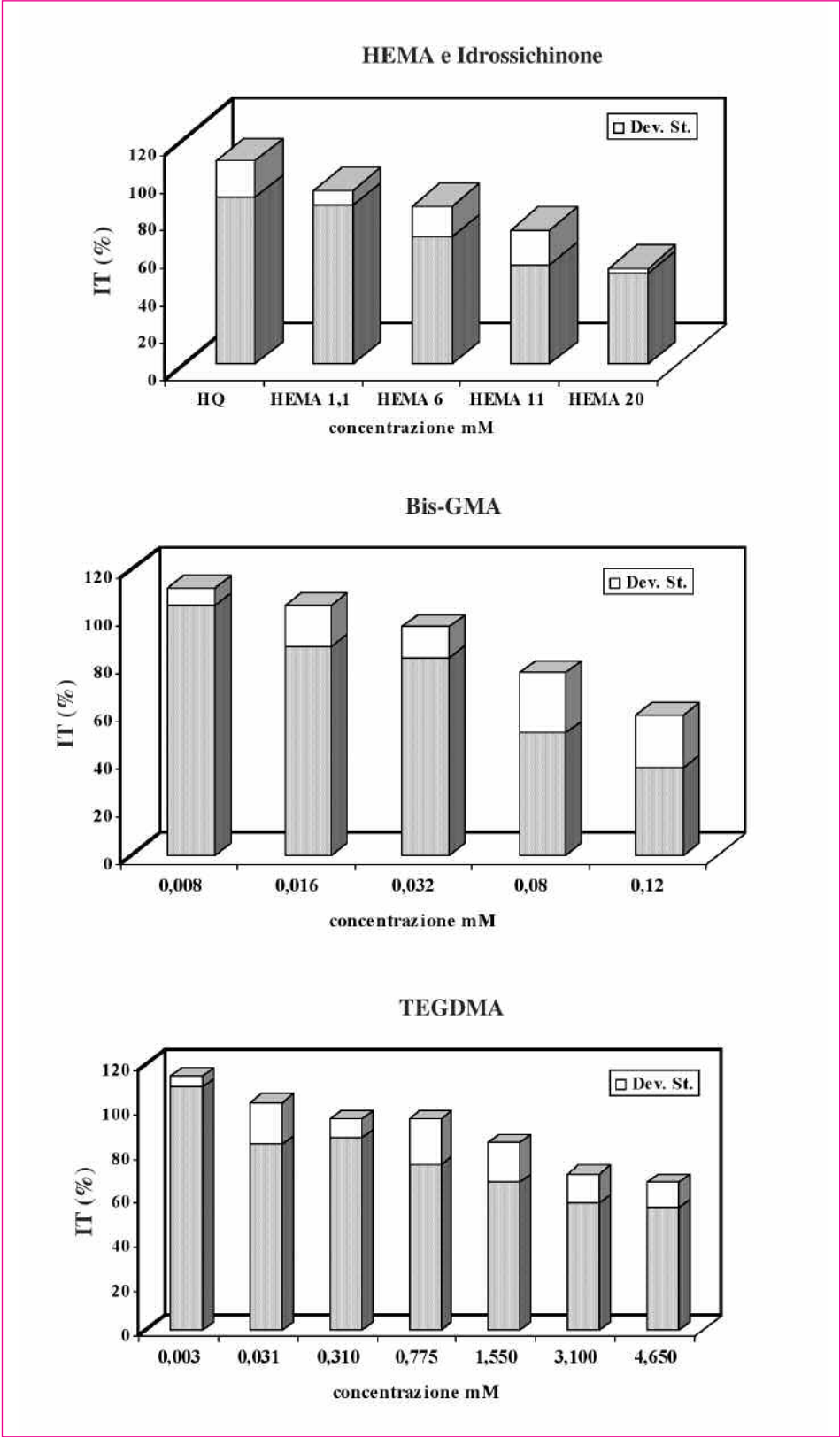
Le cellule THP-1 trattate con TEGDMA a valori di concentrazione di 3.10 mmol/L e 4.65 mmol/L ($p < 0.05$) mostrano una riduzione dell'attività della NADPH-ossidasi di circa il 35-40%, mentre quelle trattate con Bis-GMA e HEMA non rivelano diminuzioni statisticamente significative (Tab. 3).

Attività della perossidasi

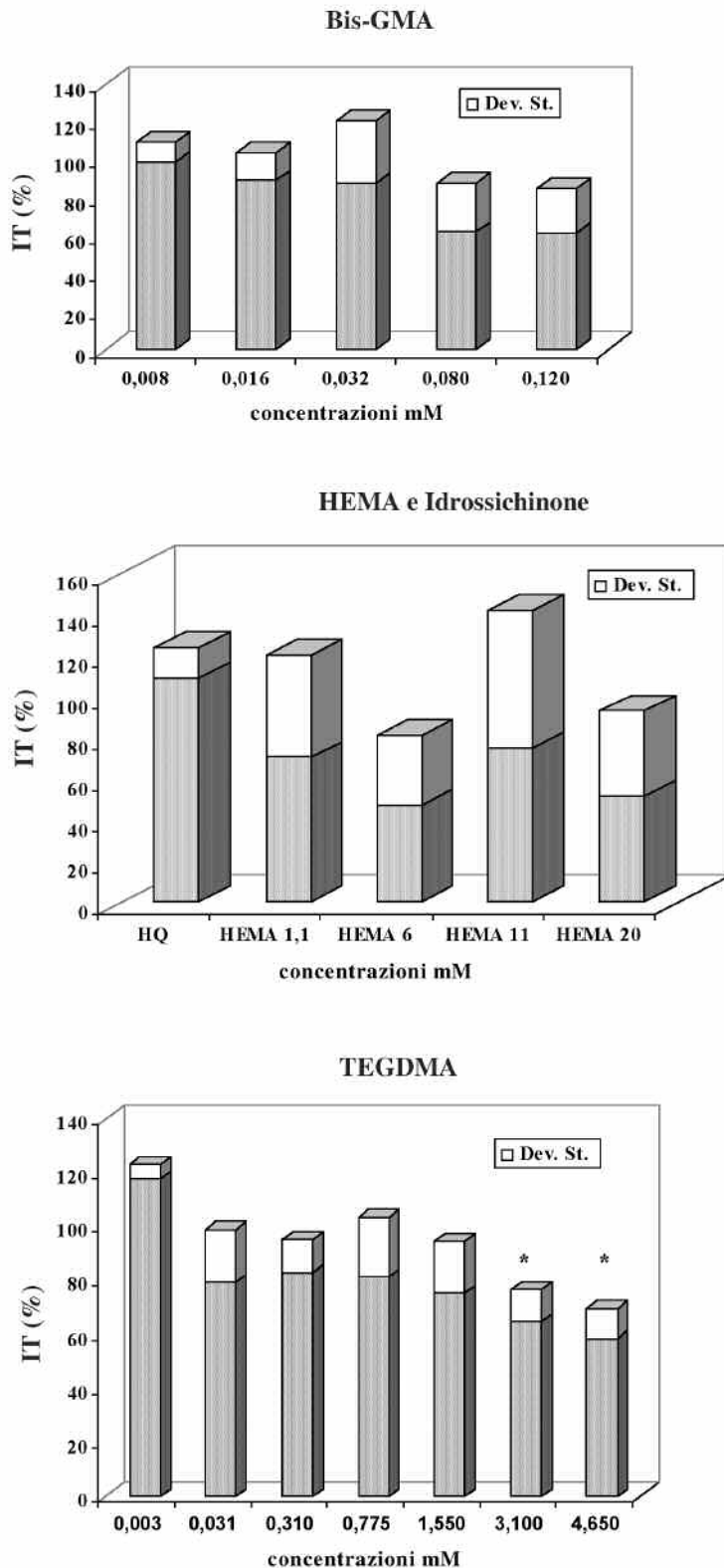
La linea cellulare THP-1 trattata con i monomeri mostra un'attività della perossidasi pari al 13.23 %.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano una significativa diminuzione del *burst* ossidativo delle cellule THP-1 differenziate, correlata alla concentrazione dei monomeri: mentre il Bis-GMA provoca una significativa diminuzione del *burst* ossidativo solo a concentrazioni pari alla TC_{50} , sia HEMA che TEGDMA mostrano l'effetto a valori più bassi delle loro TC_{50} . I dati ottenuti dagli esperimenti di proliferazione cellulare mostrano che l'osservata diminuzione del *burst* ossidativo avviene a concentrazioni non tossiche dei monomeri: questo risultato evidenzia l'importanza della valutazione dell'alterazione di questo parametro funzionale negli studi preliminari di biocompatibilità di materiali dentali. Ne deriva che è possibile ipotizzare danni funzionali anche quando test di citotossicità non elicitano risposte significative. I risultati ottenuti, che rivelano una riduzione della funzionalità cellulare in presenza dei monomeri, aprono la strada per future indagini quali: la determinazione dei valori di concentrazione dei monomeri che possono determinare *in vivo* gli stessi fenomeni osservati *in vitro*, la valutazione degli effetti clinici dell'alterazione del *burst* ossidativo sulla funzionalità dei monociti-macrofagi e dell'importanza dell'analisi funzionale negli studi preliminari di biocompatibilità dei materiali dentali.



Tab. 2 - Per gli stessi monomeri e concentrazioni della tabella precedente l'analisi funzionale con sonda lucigenina: la chemiluminescenza mostra alterazioni funzionali (riduzione del *burst* ossidativo valutato come indice di trattamento - IT).



Tab. 3 - L'analisi funzionale di chemiluminescenza con la sonda luminolo evidenzia differenze fra i vari monomeri (riduzione del burst ossidativo valutato come indice di trattamento - IT) solo con il TEGDMA.

Il *burst* ossidativo consiste in una produzione di ROS durante la fagocitosi di microrganismi da parte dei fagociti professionali del sistema immunitario: questa produzione dipende dall'azione della NADPH-ossidasi di membrana (17,18), un enzima che catalizza la riduzione - da parte del NADPH - di ossigeno molecolare ad anione superossido (O_2^-) oppure a perossido di idrogeno (H_2O_2). Inoltre enzimi cellulari quali la mieloperoxidasi (MPO) catalizzano la reazione tra le specie reattive dell'ossigeno e gli alogenioni - attraverso un'attività perossidativa e clorurante (20) - per ottenere differenti prodotti alogenati (19); alcune sonde, come il luminolo, originano la loro chemiluminescenza da questa reazione. All'anione superossido extra-cellulare O_2^- è invece attribuita l'attività di chemiluminescenza della lucigenina, una molecola che registra solo eventi extracellulari (21,22) poiché è troppo grande per poter entrare nelle cellule; il relativamente piccolo luminolo, al contrario, ritenuto in grado di attraversare le membrane cellulari, può registrare anche gli eventi intracellulari (20). La minore sensibilità del luminolo rispetto alla lucigenina deriva dalle caratteristiche delle due sonde: la reazione di eccitazione con il luminolo è catalizzata principalmente dalla mieloperoxidasi (19) mentre la luminescenza della lucigenina è indipendente da questo enzima. Poiché le cellule THP-1 differenziate mostrano una scarsa attività della MPO, l'eccitazione del luminolo e quindi l'intensità della chemiluminescenza sono ridotte.

È ben noto che - durante il *burst* ossidativo - il glutatione cellulare (GSH) è trasferito sotto la membrana plasmatica (29) e che i composti metilacrilici mostrano - in alcune linee cellulari - una capacità di esaurimento del GSH (30, 31). In questo lavoro i risultati degli esperimenti condotti in presenza di NAC - fornitore di precursori del GSH - dimostrano chiaramente che la diminuzione del *burst* ossidativo permane in presenza di tale composto e che quindi tale diminuzione non può essere attribuita ad una perdita di glutatione.

In conclusione, possiamo affermare che la constatazione di un danno funzionale delle cellule THP-1, indipendente dalla mortalità cellulare ed attribuibile all'azione dei monomeri, può portare in futuro allo sviluppo dei seguenti studi:

- determinazione delle condizioni nelle quali siano presenti *in vivo* gli stessi effetti osservati *in vitro*;
- valutazione delle possibili conseguenze cliniche dell'alterazione del *burst* ossidativo dei macrofagi.

BIBLIOGRAFIA

1. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996; 24:125-128.
2. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*.1998; 41:474-480.
3. Leinfelder KE. Current status of dentin adhesive systems. *Alpha Omegan* 1998; 91: 17-22.
4. Tanaka J, Ishikawa K, Yatani H, Yamashita A, Suzuki K. Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. *Dent Mater J* 1999; 18:11-18.
5. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000; 79:1385-1391.
6. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil* 1998; 25: 45-51.
7. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 1996; 22: 244-248.
8. Walther UI, Walthe SC, Liebl B, Reichl FX, Kehe K, Nilius M, Nickel R. Cytotoxicity of ingredients of various dental materials and related compounds in L2- and A549 cells. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2002; 63:643-649.
9. Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 1984; 5: 5-10.
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.
11. Auger MJ. The biology of the macrophage. In: Lewis, C.E. & McGee, J.O., eds *The Macrophage*, Oxford Univ. Press, 1992; 3-6.
12. Miller KM, Anderson JM. In vitro stimulation of fibroblast activity by factors generated from human monocytes activated by biomedical polymers. *J Biomed Mater Res (Appl. Biomater)*. 1989; 23: 911-930.
13. Schuster GS, Lefebvre CA, Wataha JC, White SN. Biocompatibility of posterior restorative materials. *J Calif Dent Assoc* 1996; 24: 17-31.
14. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 292-299.
15. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. In vitro synergistic, antagonistic, and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1992; 26:1297-1309.
16. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985; 24:119-124.
17. Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959; 234:1355-1362.
18. Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1999; 179 Suppl 2: S309-S317.
19. Dahlgren C and Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Meth* 1999; 232: 3-14.
20. Parij N, Nagi AM, Fondu P, Nève J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1998; 352: 299-305.
21. De Chatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol* 1982; 129: 1589-1593.
22. Kitagawa RR, Goncalves Raddi MS, Najeh Maissar Khalil, Vilegas W, Da Fonseca LM. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 905-908.
23. 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.
24. De Sole P, Fresu R, Frigieri L, Pagliari G, De Simone C, Guerriero C. Effect of adherence to plastic on peripheral blood monocyte and alveolar macrophage chemiluminescence. *J Biolumin Chemilumin* 1993; 8: 153-158.
25. De Baeselier P, and Schram E. Luminescent bioassay based on macrophage cell lines. *Methods Enzymol* 1986;133: 507-530.
26. Lee SH, Brennan FR, Jacobs JJ, Urban RM, Ragsa DR, Glant TT. Human monocyte/macrophage response to cobalt-chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacement. *J Orthop Res* 1997; 15: 40-49.
27. 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.
28. Wataha JC, Lockwood PE, Marek M, Ghazi M. Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells in vitro. *J Biomed Mater Research (Appl Biomater)* 1999; 45:251-257.
29. Seres T, Knickelbein RG, Warshaw JB, Johnston RB jr. The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione. *J Immunol* 2000; 165: 3333-3340.
30. Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, Von Neuhoff N, Schlegelberger B, Geurtsen W. Effects of Bis-GMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2004; 25: 4573-4580.
31. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res (Appl. Biomater)* 2002; 63: 746-51.
32. Forman HJ, Torres M. Signalling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* 2001;51:365-371.
33. Iles KE and Forman HJ. Macrophage signalling and respiratory burst. *Immunol Res* 2002; 26: 95-105.