

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**



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

*Dottorato in Scienze Odontostomatologiche
XXVII° ciclo*

*N-acetil-cisteina regola l'attività trascrizionale delle
Metalloproteinasi di matrice-2 e -9, in fibroblasti pulpari
umani stimolati con le resine monomeriche TEGDMA ed
HEMA*

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

RELATORE

*Chiari. ssimo
Prof. S. Rengo*

CANDIDATO

Dr. Alfredo Procino

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	p.4
1. Rilascio e tossicità dei monomeri.....	p.4
1.1 I monomeri dentari inducono apoptosi e necrosi.....	p.7
1.2 Ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e del glutatione nella tossicità dei monomeri.....	p.9
1.3 Signaling nell'apoptosi indotta da monomeri.....	p.12
1.4 Effetti genotossici dei monomeri dentari e regolazione del ciclo cellulare.....	p.14
1.5. Metalloproteinasi(MMP).....	p.17
1.6 Struttura e attivazione delle MMPs.....	p.17
1.7 Inibitori delle tissutali MMPs (TIMP).....	p.18
1.8 Ruolo delle MMPs.....	p.19
1.9 MMPs nella patogenesi della paradontite.....	p.20
2. MMPs nelle carie, nella polpa e nella patogenesi periapicale.....	p.21
2. SCOPO DELLA TESI.....	p.27
3. MATERIALI & METODI	
3.1 Colture cellulari	p.28
3.2 Condizioni sperimentali.....	p.28
3.3 Citotossicità (MTT).....	p.29
3.4 Estrazione RNA totale.....	p.29
3.5 Retrotrascrizione.....	p.29
3.6 RealTime-PCR (QRT-PCR).....	p.30
3.7 Western Blotting.....	p.30
4. RISULTATI	
4.1 Saggio MTT.....	p.32
4.2 QRT-PCR.....	p.32
4.3 Western Blott.....	p.33
4.4 Stimolazione di HPC con TEGDMA ed HEMA e successivo trattamento con N-Acetil- Cisteina (NAC).....	p.33
4.5QRT-PCR in cellule staminali mesenchimali (MSCs) trattate con TEGDMA ed HEMA.....	p.34

5.DISCUSSIONE.....p.41

6.BIBLIOGRAFIA..... p.44

1. INTRODUZIONE

1. RILASCIO E TOSSICITÀ DEI MONOMERI

Negli ultimi 30 anni, l'odontoiatria conservativa è stata caratterizzata da una rivoluzione innescata dall'introduzione di materiali da otturazione estetici, che ha determinato un significativo cambiamento delle tecniche per rispondere a esigenze e richieste dei pazienti. In particolare i nuovi approcci terapeutici sono stati resi possibili con l'introduzione e lo sviluppo di nuovi materiali a base resinosa (resin-based dental materials / RBDM) che hanno introdotto il concetto di adesione alle strutture dentarie. Non tutti i cambiamenti che hanno determinato la "rivoluzione conservativa" sono avvenuti senza polemiche e preoccupazione da parte degli operatori. L'uso di innovativi RBDM contenenti nuove molecole chimiche, così come la necessità di assicurarne una completa polimerizzazione, ha sollevato problematiche circa la loro sicurezza biologica. Una delle principali proprietà dalla quale i RBDM non possono prescindere è, infatti, la biocompatibilità, ovvero la compatibilità nei confronti dei tessuti e dei fluidi corporei.

Il tema biocompatibilità e tossicità in odontoiatria conservativa è legato essenzialmente al rilascio di monomeri e di reagenti (attivatori, iniziatori, stabilizzatori, inibitori, etc.), presenti nei materiali stessi. Numerosi studi hanno confermato che monomeri come bisphenol A diglycidyl dimethacrylate (Bis-GMA), urethane dimethacrylate (UDMA), comonomeri come il triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) o iniziatori, come il camphorquinone (CQ), sono liberati da resine composite, cementi vetroionomerici ed adesivi dentinali. (Geurtsen, 2000; Santerre et al., 2001; Michelsen et al., 2003). I monomeri dentari possono essere rilasciati verso i tessuti del cavo orale e all'interfaccia dente-materiale sia a seguito di un'incompleta polimerizzazione che come conseguenza della degradazione della matrice resinosa. Inoltre una volta rilasciati, i monomeri dentari possono essere assorbiti rapidamente dal nostro organismo formando metaboliti intermedi che risultano essere più tossici del monomero stesso (Reichl FX et al., 2002). Dal punto di vista strettamente clinico

bisogna considerare che i monomeri possono diffondere attraverso i tubuli dentinali in concentrazione sufficiente a determinare un danno pulpare (Bouillaguet et al., 2000; Noda et al., 2002), tanto più che i sistemi adesivi utilizzati nella nostra pratica sono posti su una dentina condizionata e vicina alla polpa, dove è maggiore la densità ed il numero di tubuli dentinali (Pashley, 1985; Pashley et al., 1993). Il danno biologico pulpare che può derivare dalla degradazione delle matrici polimeriche e dalla polimerizzazione incompleta dei monomeri dipende da vari fattori: a) il componente deve avere proprietà tossiche; b) il componente deve avere proprietà, quali la solubilità, che favoriscono la sua diffusione verso la polpa; c) il tempo e la dose di reagente a cui è esposta la polpa deve essere sufficiente a dare una reazione biologica (e.g. infiammazione, etc.).

Nonostante gli innumerevoli restauri che vengono fatti in tutto il mondo, il basso numero di problematiche biologiche riportate con i RBDM è testimonianza della loro apparente biocompatibilità. Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato i potenziali rischi associati al rilascio di monomeri, quali effetti immunologici locali (Jontell et al., 1995), reazioni apoptotiche (Janke et al., 2003; Spagnuolo et al., 2004) e reazioni infiammatorie (Hebling et al., 1999). Inoltre altre ricerche hanno documentato che i RBDM possono avere effetto estrogeno sistemico (Schafer et al., 1999), dare reazioni allergiche (Katsuno et al., 1996) o addirittura avere effetto cancerogeno (Schweikl and Schmalz, 1999). Sebbene alcuni autori suggeriscano che la tossicità diretta dei monomeri sulla polpa possa essere significativamente limitata da un sufficiente spessore dentinale (Pashley et al., 1993; Galler et al., 2005) e da un'appropriata polimerizzazione del materiale (Geurtsen, 2000), non bisogna trascurare che anche un rilascio prolungato di concentrazioni sub-tossiche di monomero può provocare modificazioni della normale risposta cellulare ed infiammatoria (Noda et al., 2003). Da qui si comprende perchè è obbligatorio conoscere i rischi biologici associati all'utilizzo di questi materiali. Del resto, fin dall'introduzione dei RBDM è stata enfatizzata l'importanza di identificare in vitro il potenziale citotossico dei materiali dentari e degli eventuali componenti responsabili della loro citotossicità (Hanks et al.,

1991). Al giorno d'oggi il progresso della biologia cellulare e molecolare ha fornito nuovi strumenti, materiali e metodiche che hanno permesso lo sviluppo di innovative strategie per lo studio in vitro della biocompatibilità dei materiali e dei monomeri dentari. Nei primi anni della ricerca biologica sui RBDM l'attenzione è stata posta sulla quantificazione degli effetti citotossici dei materiali compositi, dei compomeri o degli adesivi dentinali in varie linee cellulari, valutando differenti parametri quali: il danno alla membrana cellulare, l'inibizione di attività enzimatiche, della sintesi di proteine e degli acidi nucleici, o semplicemente la sopravvivenza delle cellule ad un determinato trattamento. Questi studi hanno mostrato un ampio e differente range di citotossicità che era dipendente non solo dalle diverse tipologie di materiali resinosi testati, ma anche dalle metodiche sperimentali e dalle linee cellulari utilizzate (Ratanasathien et al., 1995; Schweickl and Schmalz, 1996; Geurtsen et al., 1998a). Comunque il risultato di questi studi in vitro fu che la maggior parte dei monomeri e dei co-monomeri della componente organica dei materiale dentali resinosi risultò essere citotossica (Geurtsen et al., 1998b; 2000; Schmalz, 1998; Bouillaguet, 2004). Grande attenzione è stata posta anche verso l'individuazione delle singole molecole rilasciate dai materiali che, interagendo con le strutture cellulari, potevano essere causa degli effetti tossici. Tra i monomeri rilasciati dai materiali resinosi quelli più frequentemente individuati e rappresentati sono HEMA e TEGDMA (Spahl et al., 1998). E' stato ipotizzato che, dopo l'utilizzo di sistemi adesivi o bonding, le concentrazioni raggiunte a livello pulpare da HEMA e TEGDMA, rilasciati attraverso la dentina, possono raggiungere 1,5-8 mmol/l per l'HEMA e 4 mmol/l per il TEGDMA (Bouillaguet et al., 1996; Noda et al., 2002). E' stato ampiamente confermato che queste stesse concentrazioni sono in grado di causare numerosi effetti biologici in vitro, primo tra tutti una diminuzione della vitalità cellulare (Geurtsen, 2000). Sebbene le varie le metodiche utilizzate finora hanno permesso di quantificare la tossicità dei monomeri e materiali resinosi, valutando gli effetti sulle principali funzioni cellulari, sicuramente non hanno ancora chiarito la causa, ovvero i meccanismi molecolari che sono alla base della citotossicità stessa. Recentemente

sono stati fatti grossi sforzi per l'identificazione dei fenomeni cellulari che possono essere responsabili della citotossicità dei monomeri dentari, quali il tipo di danno e morte a cui vanno incontro le cellule (apoptosi o necrosi), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la deplezione di GSH, il blocco del ciclo cellulare, la formazione di micronuclei e, soprattutto, l'inibizione o induzione di pathway fondamentali per la sopravvivenza o la morte della cellula.

Lo scopo di questa review è presentare i recenti progressi ottenuti in ambito di citotossicità dei monomeri dentari. Nel lavoro viene rivolta particolare attenzione agli sforzi fatti recentemente nel campo per individuare i pathways intracellulari coinvolti nel danno cellulare ed il ruolo dei ROS nelle risposte cellulari indotte dai monomeri. Inoltre vengono anche presentate gli ultimi studi sulle alterazioni del normale ciclo cellulare come conseguenza indotta dallo stress genotossico causato dai monomeri.

1.1 I MONOMERI DENTARI INDUCONO APOPTOSI E NECROSI

Quando stimulate da una noxa che determina un danno irreversibile le cellule possono andare incontro a morte per necrosi o per apoptosi. In generale la necrosi è determinata da un insulto massivo letale, è un processo passivo conseguente ad un danno grave ed irreversibile che porta alla perdita sia delle funzioni cellulari che dell'integrità della membrana plasmatica (Majno and Joris, 1995).

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo fisiologico che gioca un ruolo fondamentale nel normale sviluppo degli organi, nell'omeostasi cellulare, nel funzionamento del sistema immunitario, nell'invecchiamento e nella risposta a stimoli tossici, ma anche nella patogenesi di molte malattie. Il meccanismo cellulare che sottende all'esecuzione dell'apoptosi è innescato o meno in base al bilancio tra fattori pro-apoptotici ed anti-apoptotici (Burlacu, 2003; Haupt et al., 2003). Specifiche proteasi, conosciute come caspasi, sono le principali esecutrici del programma apoptotico (Nicholson and Thornberry, 2003). Due differenti vie attivano le caspasi, una dalla membrana cellulare attraverso stimoli recettoriali (extrinsic pathway) e l'altra dai mitocondri (intrinsic pathway). Le caspasi iniziatrici (delle quali fanno

parte le caspasi -8, -9, -10, -12) sono strettamente associate a vari stimoli pro-apoptotici (FasL, TNF, DNA damage e altri), e, una volta clivate a loro volta attivano caspasi effettrici (caspasi -3, -6 e -7). Il culmine di questa cascata consiste nel clivaggio di un certo numero di proteine, seguito dal disassemblamento cellulare: la cromatina si condensa, il DNA viene frammentato dalle endonucleasi, il citoplasma forma estroflessioni e la cellula si suddivide in frammenti denominati ‘corpi apoptotici’, che vengono fagocitati dai macrofagi o dalle cellule adiacenti (Nicholson and Thornberry, 2003).

Al contrario dell’apoptosi, la necrosi di solito determina infiammazione associata a segni clinici per il rilascio da parte delle cellule dei prodotti metabolici dell’acido arachidonico (Majno and Joris, 1995; Zhivotovsky, 2004). Questa significativa differenza giustifica il grande interesse che ha spinto i recenti studi a determinare la risposta, apoptotica o necrotica, delle cellule del cavo orale (human gingival and pulpal fibroblasts) ai differenti monomeri dentari. Infatti i monomeri che inducono apoptosi e non necrosi in vitro, potrebbero risultare più vantaggiosi dal punto di vista clinico in quanto in vivo ne risulterebbe un fenomeno confinato alla popolazione che è andata incontro a morte senza infiammazione. Al contrario, monomeri che inducono prevalentemente necrosi determinerebbero un’estensione del processo a tutto il tessuto con una sintomatologia clinica infiammatoria.

C’è una crescente evidenza che i RBDM causino morte cellulare innescando i processi apoptotici. Questo fenomeno è stato osservato in molte linee cellulari dopo esposizione ad estratti di materiali compositi e metacrilati (Cimpan et al., 2000a; Cimpan et al., 2000b; Quinlan et al., 2002). L’apoptosi indotta dalle resine adesive in cellule odontoblasto-simili di topo (MDPC-23), cellule pulpari indifferenziate (OD-21) o macrofagi (RAW 264.7) è dipendente dal grado di polimerizzazione (Mantellini et al. 2003). Queste evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo rilevante dei monomeri resinosi che non hanno polimerizzato nell’induzione della morte cellulare programmata.

Recentemente sono stati individuati i singoli componenti delle resine capaci di indurre apoptosi o necrosi in cellule normali primarie. In fibroblasti gengivali umani primari (HGF) il TEGDMA induce principalmente apoptosi rispetto a necrosi (Janke et al., 2003); il Bis-GMA influenza la concentrazione di glutazione e la percentuale di cellule apoptotiche: la deplezione del contenuto intracellulare di GSH è simultanea all'induzione dell'apoptosi (Engelmann et al., 2004). Il TEGDMA induce apoptosi anche in fibroblasti pulpari umani primari (HPC); le popolazioni apoptotiche e necrotiche aumentano in maniera differente dopo esposizione a concentrazioni crescenti di monomero: nei HPC esposti ad una concentrazione di TEGDMA 1 mM è stato riscontrato un raddoppio delle cellule apoptotiche e solo un lieve incremento di quelle necrotiche. Al contrario a concentrazioni più alte è stato evidenziato un forte incremento della popolazione necrotica (Spagnuolo et al., 2004b). E' stato dimostrato che anche l'HEMA induce apoptosi (Spagnuolo et al., 2004a; Paranjpe et al., 2005). In particolare anche HEMA, così come TEGDMA, causa in fibroblasti umani primari di cute morte cellulare dovuta principalmente ad apoptosi piuttosto che a necrosi. Questo è stato confermato anche dimostrando l'attivazione delle caspasi -8 e -9 e del loro comune effettore a valle caspase -3 (Spagnuolo et al., 2004a).

1.2 RUOLO DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS) E DEL GLUTATIONE NELLA TOSSICITÀ DEI MONOMERI

La morte cellulare è controllata, all'interno della cellula, da numerosi fattori compreso un giusto equilibrio tra specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi di protezione antiossidanti. I ROS (perossido di idrogeno, anione superossido e radicale idrossile) vengono prodotti durante le reazioni di ossidoriduzione dei normali processi metabolici. Comunque le principali fonti intracellulari di ROS, sono i mitocondri, gli enzimi del citocromo P450 e i perossisomi. Inoltre i ROS possono essere anche prodotti in conseguenza a stimoli esterni come: l'esposizione a luce UV, l'assorbimento di energia radiante o anche ad altri stimoli ambientali (Shackelford et al., 2000; Feinendegen, 2002; Droge, 2002) (Fig. 1). Infine i ROS sembrano

contribuire alla patogenesi di numerose malattie e all'invecchiamento (Luchsinger and Mayeux, 2004; Mattson, 2004; Zecca et al., 2004).

Al fine di prevenire il danno ossidativo, le cellule hanno sviluppato un complesso sistema di difesa antiossidante che include scavenger non enzimatici (come glutatione, thioredoxin) o con attività enzimatica come superoxide dismutase (SOD), thioredoxin reductase (TRxR), glutathione peroxidase 1 (GPx), glutathione reductase, catalase (CAT) (Haddad, 2002; Levonen et al., 2004; Mathers et al., 2004; Watson et al., 2004) (Fig. 1). Quando la produzione di radicali liberi eccede la capacità della cellula di metabolizzarli, le proteine e il DNA vengono danneggiati conducendo la cellula a morte per apoptosi o necrosi (Shackelford et al., 2000; Barzilai and Yamamoto, 2004; Boonstra and Post, 2004).

Il possibile coinvolgimento dei ROS quali molecole di segnalazione nell'apoptosi è un'acquisizione recente. Sebbene siano numerosi gli effetti dannosi dei ROS (perossidazione lipidica, modificazioni ossidative delle proteine, danno al DNA), è da tempo acclarato che le specie reattive dell'ossigeno siano implicate in differenti processi fisiologici, quali mediatori nei pathway di trasduzione del segnale, induttori delle stress kinases, mitogen-activated protein kinases (MAPK) o proteine Ras. Sembra anche che differenti stimoli usino i ROS come messaggeri per l'attivazione di fattori di trascrizione, come l'activator protein-1 (AP-1) e il nuclear factor kappa B (NF-kB), controllando in questo modo l'espressione genica (Pinkus et al., 1996; Wenger, 2000; Michiels et al., 2002; Haddad, 2004; Kern and Kehrer, 2005).

Solo recentemente studi hanno investigato il legame tra la citotossicità dei materiali dentari e lo stato di ossidoriduzione della cellula. È stato dimostrato che il TEGDMA induce una rapida deplezione di glutatione (GSH) (Engelmann 2002; Stanislawski et al., 2003). Dal momento che il GSH gioca un ruolo importante nei processi di protezione e detossificazione, la rapida e ampia deplezione del deposito intracellulare di glutatione dovuta al TEGDMA può contribuire in maniera significativa all'effetto citotossico di questo monomero (Geurtsen and Leyhausen, 2001). Inoltre, la deplezione di glutatione indotta dal TEGDMA è associata, in HGF e HPC, alla

produzione di ROS (Stanislowski et al., 2003). La produzione di ROS in HPC, HGF e fibroblasti primari di cute è indotta anche dall'HEMA (Spagnuolo et al., 2004a; Chang et al., 2005; Spagnuolo et al., in press).

È stato dimostrato che la deplezione del GSH nei fibroblasti non è correlata ad un aumento del GSH ossidato (GSSG) (Lefevre et al., 2004). Il TEGDMA modifica, inoltre, l'attività della glutatione transferase P1 (GSTP1) in maniera proporzionale alla concentrazione, quindi il monomero potrebbe agire da inibitore non competitivo del glutatione, il substrato dell'enzima; la tossicità sembrerebbe quindi influenzata dall'espressione polimorfica di GSTP1 (Lefevre et al., 2004).

Gli antiossidanti, quali l'N-acetilcisteina (NAC), l'ascorbato e il Trolox (forma idrosolubile della vitamina E), sembrano essere utili nel prevenire il danno cellulare mediato dal TEGDMA e dall'HEMA (Stanislowski et al., 2003, Walther et al., 2004; Spagnuolo et al., in press). Bisogna però considerare che gli antiossidanti, in determinate condizioni, possono agire anche come pro-ossidanti (Sagrasta et al., 2002; Niki and Noguchi, 2004). Questo spiega i recenti risultati, ottenuti su HGF, che hanno mostrato che antiossidanti, come NAC, a basse concentrazioni (< 1mM) ed in presenza di HEMA possano amplificare la produzione di ROS e quindi il danno indotto dal monomero. Al contrario alte concentrazioni di NAC (>10mM) riducevano la produzione di ROS e la conseguente citotossicità del HEMA (Spagnuolo et al. 2005).

1.3 SIGNALING NELL'APOPTOSI INDOTTA DA MONOMERI

Il principale obiettivo terapeutico della ricerca sulla citotossicità dei monomeri sarebbe conoscere come inibire la morte cellulare ed il danno indotto dai monomeri stessi; a tal fine gli endpoints delle attuali ricerche sono mirati a scoprire i pathway intracellulari attivati durante il danno indotto dai monomeri dentari.

Le cellule rispondono agli stimoli endogeni o esogeni grazie ad una rete complessa e coordinata di vie di trasduzione del segnale intracellulare. L'attivazione di una cascata di proteine chinasi è spesso un evento chiave per amplificare i segnali

extracellulari. La trasduzione del segnale attraverso MAPK avviene grazie ad una cascata di fosforilazione di proteine. La famiglia delle MAPK è suddivisa in quattro sottogruppi: ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38, JNK/SAPK ed ERK5. L'attivazione delle MAPK induce una varietà di risposte cellulari, come l'espressione di geni bersaglio, proliferazione cellulare, blocco del ciclo cellulare o apoptosi. L'attivazione di ERK 1/2 è considerata un via fondamentale nella regolazione del sopravvivenza cellulare e dell'apoptosi (Tanoue and Nishida, 2003; Torres and Forman, 2003; Dent et al., 2003; Engelberg, 2004; Kyosseva, 2004).

Il signaling cellulare attraverso la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) è un pathway di sopravvivenza distinto dalle MAPK (Downward, 2004). PI-3K è attivato soprattutto da recettori tirosino-chinasi, recettori G-protein-coupled, o integrine (Fig.3). Dopo l'attivazione di questi recettori situati sulla membrana plasmatica, PI-3K genera il secondo messaggero phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) che attiva la proteina chinasi B/AKT (PKB/Akt). PKB/Akt gioca un ruolo centrale nel reclutamento degli effettori di PI-3K (Downward, 2004). PKB/Akt è coinvolto nella regolazione dell'apoptosi e della proliferazione cellulare, infatti inibisce l'apoptosi regolando negativamente le proteine che promuovono l'espressione dei geni coinvolti nella morte cellulare, mentre regola positivamente quelli responsabili della sopravvivenza cellulare (West et al., 2002; Downward, 2004) (Fig.2).

Recentemente è stato dimostrato che il TEGDMA può indurre apoptosi (Janke et al., 2003; Spagnuolo et al., 2004b), successivamente ulteriori studi sono stati effettuati per valutare se l'induzione della morte cellulare da parte del TEGDMA avveniva attraverso l'influenza dei pathway di sopravvivenza cellulare. Da queste ricerche è stato evidenziato che il TEGDMA non induce l'attivazione di ERK 1/2, mentre al contrario, sembra che induca apoptosi in cellule pulpari primarie umane attraverso l'inibizione della fosforilazione di PKB/Akt (Spagnuolo et al., 2004b). Inoltre l'inibizione della fosforilazione di PKB/Akt, con un suo specifico inibitore (LY294002) amplificava il danno determinato dal TEGDMA. Pertanto l'inibizione di PI3-K/Akt da parte del TEGDMA potrebbe essere una delle cause più importanti

della sua citotossicità, infatti PI3-K /Akt ha il ruolo di proteggere le cellule pulpari contrastando il danno indotto dal TEGDMA (Spagnuolo et al., 2004b) (Fig.2).

Un'altra risposta cellulare che sembra essere importante nel contrastare la morte cellulare indotta dai monomeri dentari è l'attivazione del nuclear factor kB (NF-kB). NF-kB è un fattore di trascrizione che regola numerosi processi cellulari come la risposta immunitaria e agli stress, l'apoptosi, la proliferazione e la differenziazione cellulare (Ghosh and Karin, 2002; Ali and Mann, 2004). NF-kB è costituito da due subunità, che possono formare omo- ed etero-dimeri; la conformazione più conosciuta è quella p50/p65, ma sono state identificate altre subunità come p52, oltre a p105 e p100 che sono i precursori di p50 e p52 (Beinke and Ley, 2004; Schmitz et al., 2004). Il dimero p50/p65 è legato all'inibitore IκB nel citosol delle cellule non stimulate. Sono stati descritti più di cento stimoli capaci di attivare NF-kB: citochine proinfiammatorie, batteri e prodotti batterici, fattori di crescita, UV, e stress ossidativi ambientali. In seguito alla stimolazione, la fosforilazione di IκB, da parte della IκB chinasi (IKK), induce la degradazione proteolitica dell'inibitore con conseguente attivazione di NF-kB. Una volta attivato, NF-kB è libero di traslocare nel nucleo e trascrivere un ampio numero di geni per la produzione di citochine, chemiochine, molecole di adesione cellulare, fattori di crescita e proteasi (Yamamoto and Gaynor, 2001; Ali and Mann, 2004) (Fig.3). Un importante ruolo di NF-kB è quello di regolare l'espressione di proteine anti-apoptotiche (e.g. c-IAP-1/2, XIAP, cFLIP, Bfl-1/A1, Bcl-2 and Bcl-XL) (Karin and Lin, 2002; Karin et al., 2002). Inoltre numerosi studi supportano l'idea che i ROS possano mediare l'attivazione di NF-kB (Michiels et al., 2002; Zhang and Chen, 2004; Haddad, 2004), anche se recentemente ci sono opinioni discordanti riguardo l'attivazione diretta di NF-kB da parte dei ROS (Hayakawa et al., 2003). Comunque, è stato dimostrato che l'attivazione di NF-kB può prevenire gli stress ossidativi incrementando i livelli di thioredoxin e MnSOD (Sakon et al., 2003; Pham et al., 2004; Djavaheri-Mergny et al., 2004) (Fig.3). Ultimamente è stato dimostrato, in fibroblasti primari umani, che NF-kB gioca un ruolo fondamentale nella tossicità dell'HEMA. HEMA induce un aumento dei livelli

di ROS, che sono in parte responsabili dell'attivazione di NF-kB (Spagnuolo et al., 2004b). Bloccando i ROS e quindi l'attivazione di NF-kB tramite un inibitore specifico, pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC), si aveva un aumento della morte cellulare e della citotossicità del HEMA. Questo risultato è stato supportato anche dal fatto che fibroblasti embrionali di topo (MEF) derivati da topi knockout per p65 (p65^{-/-}), quindi con NF-kB non funzionante, sono più suscettibili al danno da HEMA rispetto a fibroblasti normali. In effetti questo risultato ha fornito alcune fondamentali informazioni: 1. la dubbia responsabilità dei ROS nella citotossicità del HEMA, poiché la loro riduzione, tramite PDTC, non riduce del tutto il danno cellulare indotto; 2. la produzione di ROS indotta dall'HEMA è essenziale per l'attivazione di NF-kB; 3. l'attivazione di NF-kB è fondamentale nel contrastare la citotossicità del HEMA (Spagnuolo et al., 2004a).

1.4 EFFETTI GENOTOSSICI DEI MONOMERI DENTARI E REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Numerose evidenze sperimentali supportano l'idea che il DNA sia uno dei target molecolari dei monomeri rilasciati dai RBDM. Gli effetti genotossici riscontrati in batteri e cellule di mammifero sono indicativi rispetto all'interazione tra DNA e alcuni monomeri. Finora sono state dimostrate significative differenze nel potenziale genotossico tra i vari metacrilati, ad esempio non è stata riscontrata genotossicità del Bis-GMA e dell'UDMA (Schweikl et al., 1998). Allo stesso modo, non sono state riscontrate mutazioni geniche in risposta ai monomeri HEMA e MMA, sebbene sia stato dimostrato che alte concentrazioni di HEMA inducano un gran numero di micronuclei che indicano aberrazioni cromosomiche in vitro (Schweikl et al., 1998; Schweikl et al., 2001). Il TEGDMA, invece, causa effetti mutageni dose-dipendenti in colture cellulari di mammifero, con un aumento delle mutazioni di 10-20 volte; inoltre provoca anche la formazione di micronuclei (Schweikl et al., 1998; Schweikl et al., 2001).

Analisi molecolari hanno mostrato che il TEGDMA induce un caratteristico spettro di mutazioni nel gene *hprt*, che è un marker selettivo per l'isolamento di cellule V79 mutate. Sono state riscontrate delezioni di intere sequenze, ma non mutazioni puntiformi (Schweikl and Schmalz, 1999). L'analisi dello spettro di mutazioni indotte dal TEGDMA nel genoma di cellule di mammifero fa ipotizzare che il monomero possa indurre un ritardo del ciclo cellulare in seguito al danno al DNA.

Il DNA mitocondriale e genomico è bersaglio di agenti esogeni ed endogeni quali ROS, raggi UV, radiazioni ionizzanti (IR), e una grande varietà di sostanze chemioterapiche. Queste sostanze producono diversi tipi di danno, tra cui la rottura dei filamenti di DNA. Come risposta la cellula ha un sistema elaborato di riparazione che tende al mantenimento dell'integrità del genoma (Shackelford et al., 1999). Il completamento con successo delle fasi G1, S e G2 del ciclo cellulare degli eucarioti è monitorato in maniera precisa da checkpoint del ciclo cellulare. Questi checkpoint sono in grado di attivare risposte al danno del DNA attraverso un'attività coordinata di proteine sensori, traduttrici ed effettrici (Nyberg et al., 2002; Sancar et al., 2004). Pertanto il ciclo cellulare può essere bloccato affinché inizi la riparazione del danno al DNA o, qualora ciò sia impossibile, l'attivazione dell'apoptosi. Comunque, difetti nel checkpoint signalling del ciclo cellulare sono disastrosi per l'integrità del genoma perché possono portare ad un danno cellulare irreversibile come mutazioni geniche o aberrazioni cromosomiche. La regolazione del ciclo cellulare è eseguita da una rete di meccanismi complessi operata da pathway dipendenti o meno da p53 (59).

Dal momento che l'attività genotossica del comonomero TEGDMA è ampiamente dimostrata, è stato ultimamente supposto che esso possa indurre un blocco del ciclo cellulare in cellule di mammifero (Schweikl et al., 2005). Recentemente è stato dimostrato che le cellule V79 esposte a TEGDMA si bloccano in maniera reversibile nella fase G2, probabilmente a causa della mancanza di un checkpoint funzionale per la fase G1 (Schweikl et al., 2005). Dal momento che la linea cellulare V79 esprime una proteina p53 inattiva, il blocco reversibile nella fase G2 è indipendente da p53. Al contrario, dopo esposizione a TEGDMA, una risposta reversibile del checkpoint in

G1, indicante una risposta cellulare al danno, è stata evidenziata in fibroblasti umani normali di cute che hanno un p53 funzionante. Un arresto prolungato in fase G1 potrebbe essere stabilizzato da un checkpoint dipendente da p53 (Schweikl et al., 2005). La maggior parte delle cellule umane primarie di polpa esposte al TEGDMA sono bloccate in fase G2, mentre non è stata riscontrata una risposta significativa in fase G1, probabilmente per la minore vitalità di queste cellule in vitro (Schweikl et al., 2005). Osservazioni sovrapponibili sono state riscontrate con fibroblasti umani gengivali e pulpari dopo esposizione ad HEMA (Chang et al., 2005). Le osservazioni su apoptosi e arresto del ciclo cellulare indotti da adesivi e bonding è in linea con le osservazioni fatte con il TEGDMA e l'HEMA come maggiori composti di questi materiali (Mantinelli et al., 2003).

1.5. METALLOPROTEINASI (MMPs)

Le metalloproteasi (MMP) sono proteine enzimatiche zinco-dipendenti coinvolte nel processo di degradazione della matrice extracellulare (Catania et al., 2007; Visse et al., 2003). Sono state identificate 24 diverse metalloproteasi, classificate in 6 gruppi sulla base della loro sequenza amminoacidica e dei substrati con i quali interagiscono (classificazione riportata in Tab 1). Le MMP vengono prodotte dalla cellula come precursori (proMMP) e, dopo esocitosi, attivate nel comparto extracellulare, anche se per alcune MMP, l'attivazione è stata evidenziata a livello intracellulare (MMP 11) (Visse et al., 2003).

La loro espressione è regolata da diversi mediatori infiammatori: citochine (IL 5), e fattori di crescita (TGF β 1) e dall'azione degli inibitori tissutali della metalloproteasi (TIMP 1, 2, 3) (Inkinenet al., 2005).

1.6 STRUTTURA E ATTIVAZIONE DELLE MMPs

Sono generalmente costituite da un prodominio, un sito catalitico, una hinge region e un dominio hemopexin-like. Il sito catalitico è caratterizzato dalla presenza di un atomo di zinco, che nella forma non attiva della proteina non è disponibile alla

formazione di legami per la presenza di una cisteina (proMMP) (Catania et al., 2007; Visse et al., 2003). L'attivazione consiste nell'esposizione del sito catalitico e quindi nella possibilità di interagire con i substrati. L'attivazione può essere di tipo enzimatico oppure non enzimatico: nel primo caso avviene per l'azione di enzimi proteolitici, fra i quali plasmina o altre MMP (Visse et al., 2003). In vitro è stata evidenziata l'attivazione delle MMP in condizioni di pH acido e alte temperature, dovuta all'azione destabilizzante di questi fattori sul legame tra cisteina e zinco, favorendone la rottura. (Visse et al., 2003)

Un meccanismo di attivazione particolare è stato riconosciuto per MMP-2: essa avviene nello spazio extracellulare in corrispondenza della superficie cellulare e necessita della presenza di due molecole di MT1 MMP e di una molecola di TIMP 2 (Visse et al., 2003). MT1 MMP è una molecola transmembranaria. In presenza di TIMP 2, si ha la formazione di un dimero di MT1 MMP cui si lega la molecola di TIMP 2. La proMMP 2 si lega al complesso, la cisteina viene scissa e l'enzima attivato (Visse et al., 2003).

1.7 INIBITORI TISSUTALI DELLE MMPs (TIMP)

Gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP) sono enzimi specifici, endogeni, coinvolti nella regolazione dell'attività delle MMP (Visse et al., 2003). Dal punto di vista strutturale hanno conformazione a cuneo, si legano al sito attivo dell'enzima bloccandolo e impedendo il legame con i substrati con cui normalmente interagiscono (Visse et al., 2003). Fino ad ora nei vertebrati sono stati identificati quattro TIMP; ognuno di essi riconosce dei substrati specifici, ma allo stesso tempo, l'assenza di uno di essi può essere compensata dall'azione degli altri (Visse et al., 2003). Oltre a regolare l'attività delle MMP, diversi studi hanno riconosciuto ai TIMP altre funzioni biologiche:

- durante l'organogenesi renale
- inibizione di fattori quali l'EGF e il basic FGF 2
- nell'apoptosi con azione antiapoptotica (Visse et al., 2003).

1.8 RUOLO DELLE MMPs

Le metalloproteasi sono le principali responsabili dell'attività collagenolitica a carico della matrice extracellulare (MEC). La MEC è la componente acellulare dei tessuti connettivi ed è costituita da una componente fibrillare (collagene, fibronectina, elastina, laminina) e una componente amorfa (costituita da una fase acquosa e da una miscela di enzimi, glicoproteine e proteoglicani) (Rosati et al., 1997). È il risultato di un equilibrio che si instaura tra la produzione e la degradazione degli elementi che la compongono ed è sottoposta ad un continuo turnover finemente regolato dai fibroblasti interstiziali, i quali producono la matrice stessa, gli enzimi che portano al suo riassorbimento e molti dei fattori responsabili del mantenimento di questo equilibrio (Rosati et al., 1997). Oltre alla funzione strutturale, l'azione proteolitica delle MMP è coinvolta in diversi meccanismi in quanto può favorire la liberazione di molecole della MEC o frammenti di molecole con diverse attività biologiche (McCawley et al., 2001; Mott et al., 2004). La proliferazione cellulare è regolata dall'azione di fattori di crescita, i quali interagiscono con recettori della superficie cellulare. Le MMP possono intervenire favorendo la liberazione o l'attivazione di questi fattori (Ahmed et al., 2007). Per citare alcuni esempi: l'azione proteolitica che MMP 1 e 3 esercitano sui proteoglicani favorisce il rilascio di FGF 2; MMP 2, 3 e 7 attaccando la decorina stimolano la liberazione di TGF β 1 (McCawley et al., 2001). L'azione delle MMP si esplica anche a carico di substrati che non fanno parte della matrice: le proteine che legano gli Insuline-like Growth Factor (IGF) vengono lisate dalle MMP e gli IGF vengono attivati (McCawley et al., 2001). In alcuni casi l'azione delle MMP è diretta su fattori di crescita per attivarli, come nel caso dell'azione delle gelatinasi (MMP 2 e 9) sul TGF β 1 o sull'interleuchina 1 (McCawley et al., 2001). La membrana basale svolge un ruolo fondamentale per la sopravvivenza delle cellule in quanto presenta diversi fattori che, se persi, portano le cellule all'apoptosi. L'azione delle MMP in questo processo potrebbe riguardare tali fattori, i quali una volta modificati dall'azione enzimatica diverrebbero promotori del processo apoptotico

(Ahmed et al., 2007; McCawley et al., 2001). È stato evidenziato che le MMP siano coinvolte nella comunicazione intercellulare, in quanto necessarie per l'azione di molecole ad azione chemiotattica o per stimolare le cellule a produrre l'uno o l'altro fattore (McCawley et al., 2001). In corso di infezioni batteriche intestinali, è stato evidenziato l'aumento dell'espressione di MMP 7 da parte delle cellule di Paneth, cui segue il rilascio di pro-difensina, molecola coinvolta nella risposta immunitaria innata che agisce distruggendo i batteri (McCawley et al., 2001).

Il ruolo delle MMP è stato indagato anche nell'ambito delle patologie tumorali partendo dall'ipotesi che, degradando la matrice e le membrane basali, porterebbero un maggior invasività della neoplasia e faciliterebbero lo sviluppo di metastasi. Diversi studi sono stati condotti utilizzando animali geneticamente modificati per le MMP in cui l'espressione era stata soppressa. In alcuni lavori sul carcinoma squamoso in topi, in cui non venivano espresse MMP 9 e MMP 11 si è osservato una riduzione della crescita neoplasia (McCawley et al., 2001). Tuttavia nel processo di degradazione della MEC diverse molecole sono coinvolte e l'eliminazione di una sola di queste non evita la capacità di invasione o di dare metastasi.

Un altro ruolo indiretto attribuito alle MMP è quello di promuovere la migrazione cellulare attivando diversi fattori ad azione chemiotattica: ad esempio il vascular endothelial growth factor (VEGF), coinvolto nello sviluppo delle ossa lunghe, il cui rilascio è permesso dall'azione della MMP (McCawley et al., 2001). La motilità e la migrazione cellulare sono meccanismi complessi che coinvolgono sia le interazioni cellula-cellula sia quelle cellula-matrice. Sicuramente le MMP, portando la degradazione della MEC, favoriscono il movimento delle cellule rompendo legami che ancorano le cellule alla matrice o alla membrana basale o ancora, alterando le membrane giunzionali. Alcuni studi attribuiscono a queste molecole, soprattutto alla metalloproteasi 2 (MMP 2), un ruolo decisivo nel processo di EMT delle cellule epiteliali del tubulo renale (Cheng et al. 2003). Principalmente si ritiene che questo enzima sia responsabile della degradazione della membrana basale

permettendo la fuoriuscita nello spazio interstiziale delle cellule epiteliali in transizione. (El-Nahas, 2003).

1.9 MMPs NELLA PATOGENESI DELLA PARADONTITE

Molte delle patologie del cavo orale trovano riscontro nella presenza di invasioni microbiche, cio` e` stato dimostrato da molto tempo. La ricerca da anni cerca di identificare fattori in grado di combattere le infezioni microbiche che si celano dietro le patologie orali. Recentemente, sono stati indirizzati studi verso una famiglia di enzimi che potrebbero risultare utili nella lotta alla microbiosi orale, questo gruppo di enzimi sono le Metalloproteinasi (MMPs) (Soresa Te et al. 2004). Nel 1962 Gross e Lapiere identificarono per la prima volta una metalloproeinasi nel girino (MMP1); passarono solo quattro anni da questa scoperta e fu identificata una collagenasi nelle gengiva umana (Fullmer et al 1966). Esistono prove significative che dimostrano come le collagenasi, insieme ad altre MMPs, svolgono un ruolo importante nella distruzione paradontale; estratti ed espianati di tessuto gengivale umano infiammato, posti in coltura presentano una maggiore attivita` collagenasica se confrontati con estratti ed espianati di gengiva sana. Inoltre l`attivita` collagenasica risulta aumentata nel fluido cervicolare gengivale (GCF) e correla con la gravita` della patologia (recensito da Uitto et al 2003). Poiché i batteri sono sempre presente nella parodontite, e` logico supporre che le collagenasi nella malattia parodontale sarebbero originate da fonti microbiche (Sorsa et al, 1987). Tuttavia, sia gli estratti di tessuto gengivale, che il GCF il collagene di tipo I come modello caratteristico dei mammiferi (Sorsa et al, 1988).

2. MMPS NELLE CARIE, NELLA POLPA E NELLA PATOGENESI PERIAPICALE

La demineralizzazione della dentina e la degradazione della matrice organica, e` causata dalla variazione di Ph acido indotta da infezioni microbiche; si ritiene che enzimi rilasciati da microbi, siano responsabili della degradazione della mtrice, alcuni

ricercatori hanno messo in discussione questo concetto (Tjaderhane et al, 1998b, Tjaderhane et al 2001). A meta` degli anni `90 e` iniziato uno studio sul coinvolgimento delle MMPs nella degradazione dentinica; infatti sono state identificate le forme pro e le forme attive delle MMP8, MMP9 e MMP2 nelle lesioni dentinali umane indotte da carie (Tjaderhane et al, 1998b). Poiché le forme attive delle MMPs hanno un'emivita breve, la presenza di metalloproteinasi nella loro forma attivata all'interno della dentina, conferma che questi enzimi sono determinanti nel processo della degradazione della matrice dentinica. Questo trova conferma nel fatto che le variazioni di Ph acide indotte dalle lesioni da carie, rappresentano il fattore di attivazione delle MMPs. Questi risultati rappresentano una base alla teoria che vede un'attivazione sequenziale demineralizzazione-MMP e degradazione della dentina (Tjaderhane et al, 1998b). L'importanza di MMPs nella progressione delle lesioni è stata anche confermata da studi in vivo in cui l'inibizione delle MMPs significativamente riduce la progressione della lesione carie dentinali (Sulkala et al, 2001).

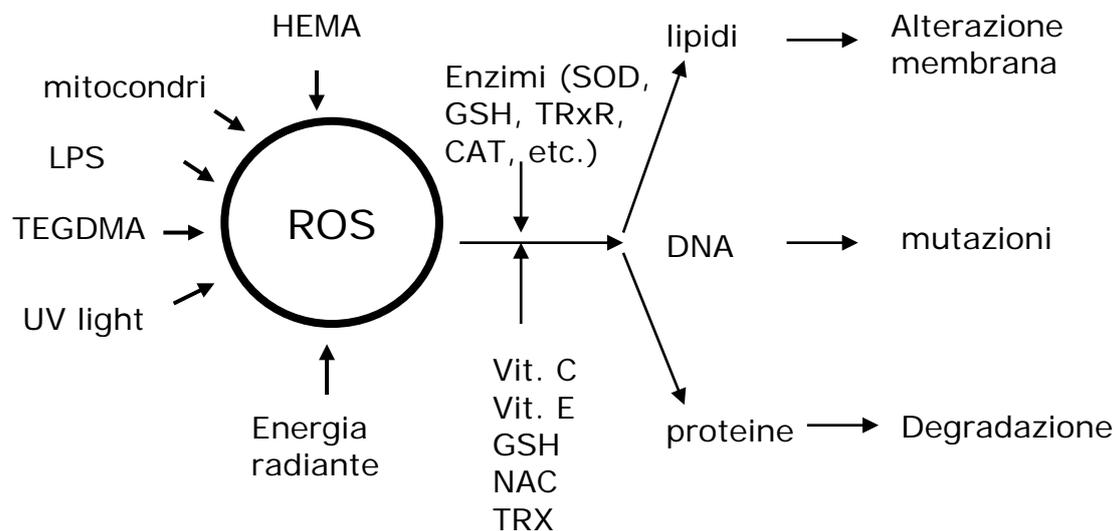


Figura 1: Produzione delle specie reattive ossidative (ROS). I ROS sono prodotti all'interno della cellula nei mitocondri durante il normale metabolismo. La quantità intracellulare di ROS aumenta a seguito dell'esposizione a raggi UV, radiazioni ed agenti chimici come i monomeri dentari. I sistemi di difesa contro i ROS sono rappresentati da antiossidanti endogeni ed esogeni (glutathione GSH, thioredoxin TRX, vitamins, N-acetyl-cysteine) oltre ad attività enzimatiche (SOD, CAT, TRxR, etc.). I lipidi, le proteine ed il DNA cellulare possono essere danneggiati se la produzione di ROS è più alta delle capacità antiossidante delle cellule.

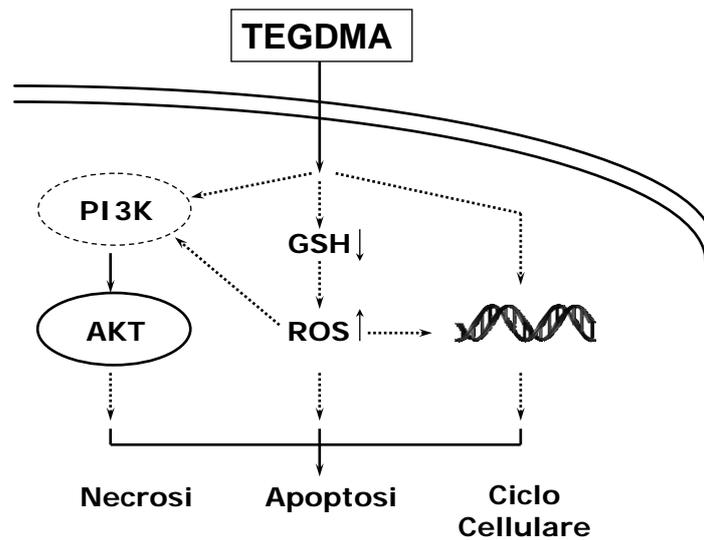


Figura 2: Influenza del TEGDMA sul pathway di Phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K). PI-3K stimola la fosforilazione (attivazione) di Akt (PKB/Akt). Akt è un elemento chiave nel controllo dei substarti fondamentali nella sopravvivenza cellulare, nel ciclo cellulare e nella sintesi di proteine. L'attivazione di Akt attraverso PI-3K è inibita in presenza di TEGDMA. Il possibile *link* tra gli elevate livelli di ROS ed il decremento di glutathione (GSH) deve essere ancora chiarito.

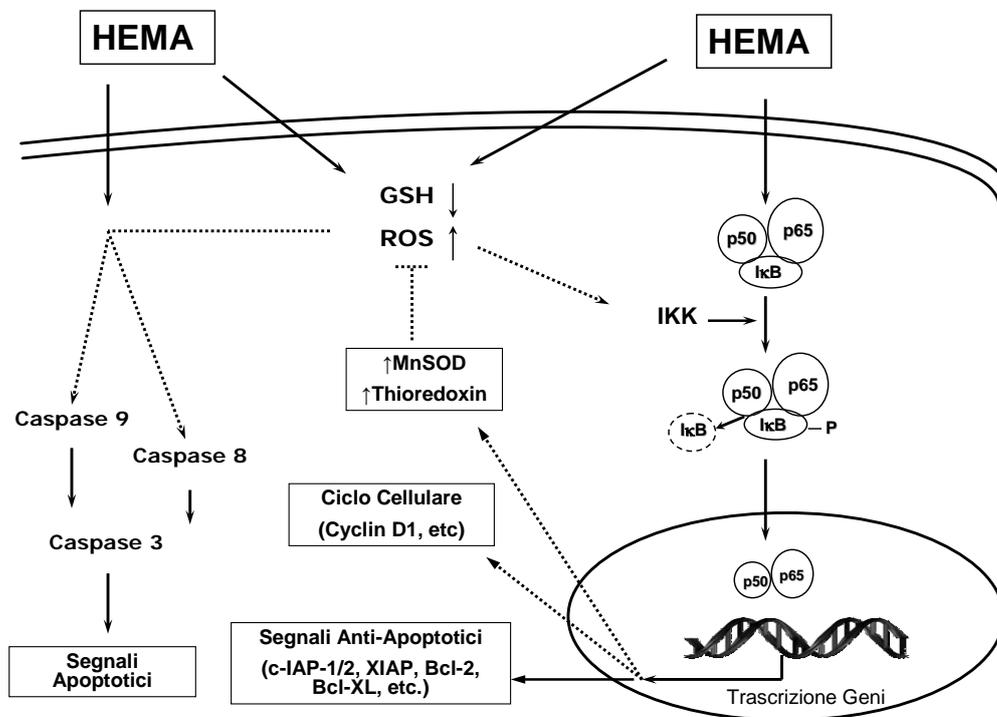


Figura 3: Attivazione dei pathways apoptotici e di nuclear factor-kappaB (NF-κB) da parte di 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). Le linee solide indicano l'evidenza sperimentale dei pathway e molecole attivate da HEMA, mentre quelle tratteggiate indicano un modello di *link* ipotetici tra gli effetti osservati in presenza del monomero. HEMA induce l'attivazione dei pathways apoptotici attraverso le Caspases. Inoltre, HEMA aumenta i livelli di ROS e reduce quelli di glutathione (GSH), ma i link molecolari tra ROS, GSH e l'attivazione delle caspases 8, 9, e 3 sono ancora da identificare. HEMA induce la degradazione di IκB (inibitore di NF-κB) e la successiva attivazione di NF-κB che a sua volta attiva i segnali anti-apoptotici, modula il ciclo cellulare (cyclin D), ed aumenta i livelli di thioredoxin (antiossidante) manganese superoxide dismutase (MnSOD = enzima antiossidante).

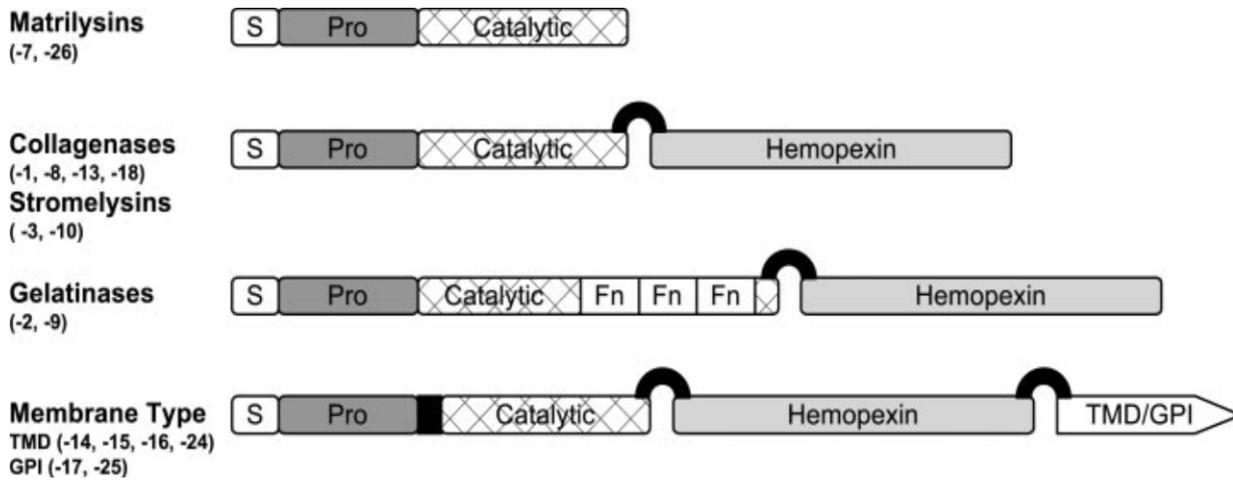


Figura 4 Struttura delle metalloproteasi.

S: sequenza di secrezione; **Pro:** prodominio; **Catalytic:** sito catalitico; **Fn:** dominio fibronectin-like; **TMD:** dominio transmembrana; **GPI:** glycosylphosphatidylinositol anchor. (Catania et al., 2007)

SCOPO DELLA TESI

Le resine monomeriche sono comunemente presenti come componenti di adesivi dentari utilizzati nella pratica odontoiatrica per i restauri adesivi. Uno dei principali problemi che si realizza è il processo di degradazione che interviene all'interfaccia dentina-restauro; questo deterioramento è determinato dall'attivazione delle metalloproteinasi di matrice, in dettaglio MMP-9 e MMP-2, presenti nella dentina. Queste proteine sono attivate dall'abbassamento del Ph dovuto alla proprietà acide delle resine (Lehmann N et al 2009).

Lo scopo di questa ricerca fonda sull'ipotesi che i geni per le MMP-2 e MMP-9 subiscono un upregulation in Fibroblasti pulpari umani (HPFs), stimolati per 24 ore con concentrazioni non tossiche dei monomeri TEGDMA ed HEMA. Inoltre abbiamo considerato la produzione delle due proteine mediante saggio di Western Blotting. Successivamente abbiamo ripetuto lo stesso esperimento prima stimolando le cellule con le resine per 24h, successivamente abbiamo rimosso lo stimolo e lasciato le cellule in mezzo di colture senza monomeri per altre 24 ore, abbiamo così osservato la capacità di recupero delle HPCs nei confronti delle due metalloproteinasi.

Inoltre abbiamo valutato l'azione protettiva dell'N-Acetil-cisteina stimolando le HPFs che precedentemente erano state stimolate per 24 ore con le resine monomeriche.

Infine abbiamo ipotizzato un interessamento profondo a carico della polpa dentaria, operato dai monomeri, pertanto abbiamo eseguito gli esperimenti nelle stesse condizioni precedentemente descritte, stimolando cellule staminali mesenchimali (MSCs).

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

Fibroblasti primari pulpari umani HPCs sono stati isolati da molari umani di donatori sani, dopo aver ottenuto il consenso informato, il protocollo è stato approvato dall'Università degli Studi di Napoli, Italia. Immediatamente dopo l'estrazione il tessuto pulpare è stato lavato in soluzione salina di fosfato (PBS), ridotto in piccoli frammenti ed incubato in mezzo di coltura specifico (DMEM) addizionato con antibiotico steptomycin 50mg/mL e 100IU/mL penicillina e Fetal Calf Serum (FBS) al 10%. I frammenti sono stati posti in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% (v/v) CO₂. I frammenti sono stati staccati dalle piastre di coltura mediante Tripsina allo 0,25% in 1mmol/L di EDTA.

Cellule mesenchimali staminali umane sono state acquistate dalla Lonza numero catalogo PT-2501. Le cellule sono state messe in piastre con mezzo di coltura specifico addizionato con steptomycin 50mg/mL e 100IU/mL penicillina e Fetal Calf Serum (FBS) al 10%; incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% (v/v) CO₂.

3.2 CONDIZIONI SPERIMENTALI

Per i nostri esperimenti abbiamo piastrato 1×10^6 cellule/mL 24h prima del trattamento. Abbiamo utilizzato le seguenti concentrazioni delle resine monomeriche per la stimolazione: 1) EtOH (Sigma Aldrich) 0,2%, 2) TEGDMA (Sigma Aldrich) 0.1 mM, 3) TEGDMA (Sigma Aldrich) 0.5 mM, 4) HEMA (Sigma Aldrich) 1mM, 5) HEMA (Sigma Aldrich) 2mM.

Successivamente le cellule sono state prima stimulate con le resine monomeriche per 24h, dopo di che abbiamo rimosso il terreno di coltura ed abbiamo effettuato un trattamento con N-Acetil-Cisteina alla concentrazione 200mmol per 2h.

3.3 CITOTOSSICITA` (MTT)

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

Poi, il mezzo è stato rimosso e i monostrati di cellule sono state esposte alle diverse concentrazioni dei due monomeri 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 ($p < 0,05$).

3.4 ESTRAZIONE DELL`RNA TOTALE

L`RNA totale è stato isolato dalle cellule usando RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) seguendo il protocollo dell`azienda. Abbiamo trattato i campioni con RNase-free DNase (Qiagen GmbH) allo scopo di prevenire l`amplificazione di DNA genomico.

3.5 RETROTRASCRIZIONE

Questa fase consiste nella trascrizione di molecole di RNA messaggero per la produzione di molecole di cDNA, ad opera dell`enzima virale "Reverse Transcriptasi". Aliquote di circa 4µg di RNA totale sono state sottoposte a retrotrascrizione per 1h a 37°C mediante l`utilizzo del kit "Ready-to go You-Primer First-Strand Beads" (cod. 27-9264-01 Amersham Pharmacia biotech), contenente in

una biglia liofilizzata sia l'enzima che i nucleotidi, in una miscela di reazione alla quale vengono aggiunti 0.5µg di Oligo-dT primer.

3.6 RealTime-PCR (QRT-PCR)

L'analisi quantitativa dell'espressione dei geni MMP-2 E MMP-9 è stata effettuata sui lisati cellulari (Fibroblasti pulpari e cellule staminali) utilizzando la tecnica RealTime-PCR (ABI prisma 7500 prodotta dall'Applied Biosystem). Per l'analisi abbiamo utilizzato 1micro/l di cDNA prodotto mediante retrotrascrizione come descritto precedentemente. La miscela di reazione inoltre prevede l'utilizzo della soluzione specifica 1X Taqman Universal Master Mix e l'aggiunta della coppia di primers specifici per ogni gene studiato in piu' il prob specifico come previsto dal principio del metodo. Primers e prob sono stati acquistati dall'Applied Biosystem.

3.7 WESTERN BLOTTING

Le cellule trattate sono state lisate dopo 24h di stimolazione utilizzando il buffer di lisi (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1% Triton x100, 0,5% Sodium deoxycholate) supplementato con 25mmol/L della mix di inibitore proteasico (Sigma Aldrich; Cod P8340), sonicato per 10min (*ca.* ≈30 pulses), centrifugato per 20min a 4 °C (20,800 G); successivamente il sovranatante è stato rimosso e ricentrifugato. L'estratto di proteine totali è stato caricato in gel di poliacrilammide SDS al 10% per elettroforesi e trasferito su membrana di nitrocellulosa usando un apparecchio per blotting (Bio-Rad). Come marcatori di peso molecolare abbiamo utilizzato SDS-PAGE standards (Bio-Rad).

La membrane di nitrocellulose è stata trattata con anticorpo primario per MMP2 di topo, anti-human (1:1000; Calbiochem, Merck Chemicals, Milan, Italy; Cod IM33) e MMP9 di coniglio antihuman (1:1000; Abcam, Cambridge, UK; cod ab52496). La reazione immunitaria è stata determinata dopo 1h di incubazione con un anticorpo secondario anti-mouse perossidasi-coniugato (1:12000; Santa Cruz Biotechnology;

Santa Cruz, CA, USA; Cod SC2031) e un anticorpo anti-rabbit (1:12000; Santa Cruz Biotechnology Cod SC2317). Le bande positive sono state identificate usando Amersham ECL System (GE Healthcare; Fairfield, CT, USA; Cod RPN2106V1-V2). Le bande sono state quantificate con il software Biorad Quantity One Software (Bio-Rad).

4. RISULTATI

4.1 SAGGIO MMT

Abbiamo sottoposto cellule pulpari umane estratte da molari sani, al test di citotossicità (MTT) con le resine monomeriche TEGDMA ed HEMA, al fine di selezionare le concentrazioni non tossiche ed ottimali da utilizzare per i successivi esperimenti di stimolazione. In base al risultato ottenuto, abbiamo individuato le concentrazioni ottimali di resine da utilizzare e pertanto abbiamo deciso di scegliere per il TEGDMA 0,1mM e 0,5mM e per l'HEMA 1mM e 5mM; poiché a queste concentrazioni abbiamo ottenuto una vitalità intorno al 70% (Fig. 1a e 1b)

4.2 QRT-PCR

Le cellule pulpari (HPC) sono state trattate con le resine monomeri TEGDMA, HEMA dopo di che abbiamo analizzato le variazioni dell'espressione dei geni MMP2 e MMP9, mediante RealTime-PCR (QRT-PCR). I risultati sono riportati nelle figure. I geni delle Metalloproteinasi-2 e -9 risultano iperespressi in HPCs trattate con le resine monomeriche rispetto alle HPC non stimolate.

La variazione dell'espressione genica risulta significativo e sembra essere correlato alla concentrazione dei materiali dentali. In dettaglio utilizzando TEGDMA 0,1mM e 0,5 mM, l'espressione gene MMP2 aumentato da 2 a 3 volte rispetto al controllo, mentre stimolando le HPC con HEMA 1mM e 2 mM, l'espressione del gene MMP2 era significativamente aumentato da 2,5 a 4,5 volte (Fig.2).

Osservando l'effetto dei monomeri sull'espressione genica della MMP9, possiamo notare che il gene è upregulated in cellule pulpari umane stimolate con HEMA 1mM e 2 mM rispetto al controllo, ma non esiste una correlazione concentrazione-effetto (Fig.3).

Lo stesso risultato è stato ottenuto analizzando la variazione dell'espressione del gene della MMP9, stimolando le HPCs con TEGDMA a concentrazione 0,1 mM e 0,5

mm; infatti, nonostante il gene MMP9 sia iperespresso, questo effetto non è non risulta una correlazione concentrazione-effetto (Fig.3).

Infine abbiamo osservato il risultato dell'espressione genica delle due metalloproteinasi ottenuto in HPC prima stimulate con le resine per 24h e successivamente trattando le stesse cellule con mezzo di coltura completo senza le due resine. Allontanando lo stimolo le variazioni di espressione genica sia MMP2 che per MMP9 rientrano entro valori simili al controllo (Fig.4-5)

4.3 WESTERN BLOTTING (WB)

Il saggio di WB per la determinazione delle proteine MMP2 e MMP9, mostra delle differenze nel grado di espressione per le due proteine. Infatti le bande relative all'espressione della proteina MMP2 ricavata dalle HPC stimulate con i monomeri TEGDMA e HEMA evidenzia un maggior grado di espressione rispetto alla proteina MMP9 ricavate dall'estratto cellulare di HPC stimulate con le resine monomeriche (Fig.4a/4b).

4.4 STIMOAZIONE DI HPC CON TEGDMA ED HEMA E

SUCCESSIVO TRATTAMENTO CON N-Acetil-Cisteina (NAC)

In questo saggio abbiamo proposto lo la stessa condizione sperimentale visto precedentemente dopo le 24h di stimolazione abbiamo trattato le cellule con NAC per 2h. L'analisi di QRT-PCR evidenzia che l'espressione genica delle metalloproteinasi MMP2 e MMP9 rientra nei valori riferibili al controllo (Fig.6-7).

4.5 QRT-PCR IN CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs)

TRATTATE CON TEGDMA ED HEMA

Cellule staminali mesenchimali sono state sottoposte alle stesse condizioni sperimentali descritte per le HPCs; successivamente abbiamo eseguito il saggio di QRT-PCR per la determinazione delle variazioni dell'espressione genica delle Metalloproteinasi MMP2 e MMP9.

L'esito del saggio evidenzia che in MSCs tratte con TEGDMA ed HEMA, i geni codificanti le metalloproteinasi MMP2 e MMP9, non subiscono variazioni nell'espressione genica rispetto al controllo (MSCs non trattate) (Fig.8-9)

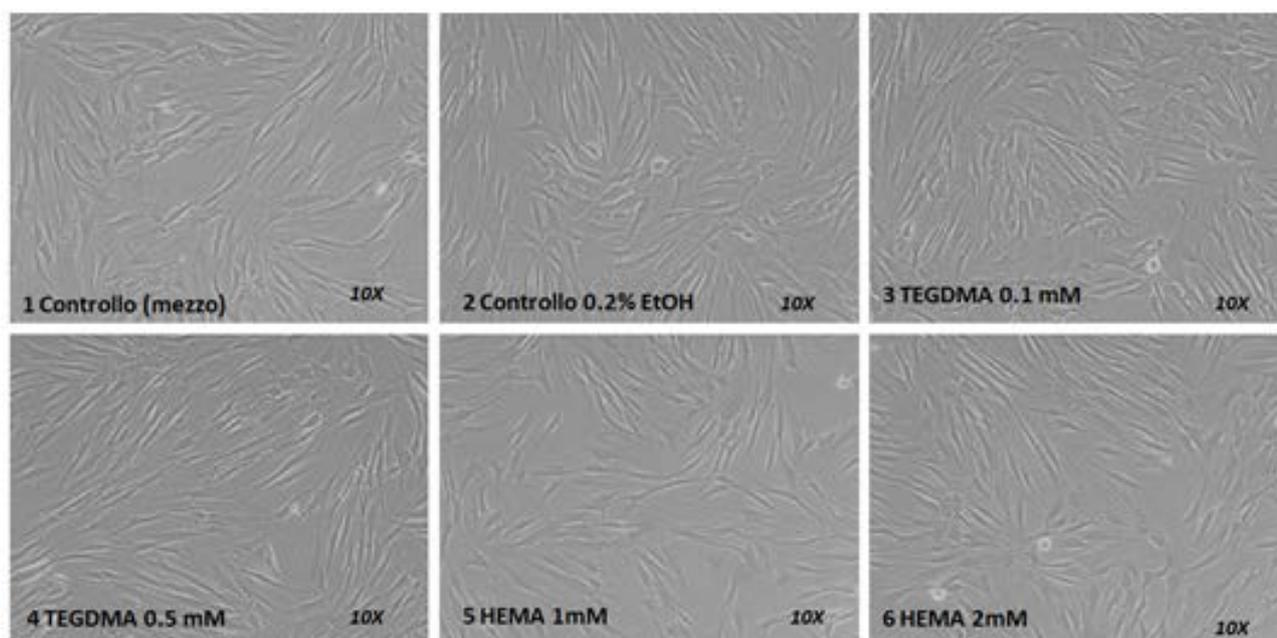


Fig 1b HPCs trattate per 24h con le resine monomeriche TEGDMA ed HEMA a concentrazioni non tossiche (vedi testo)

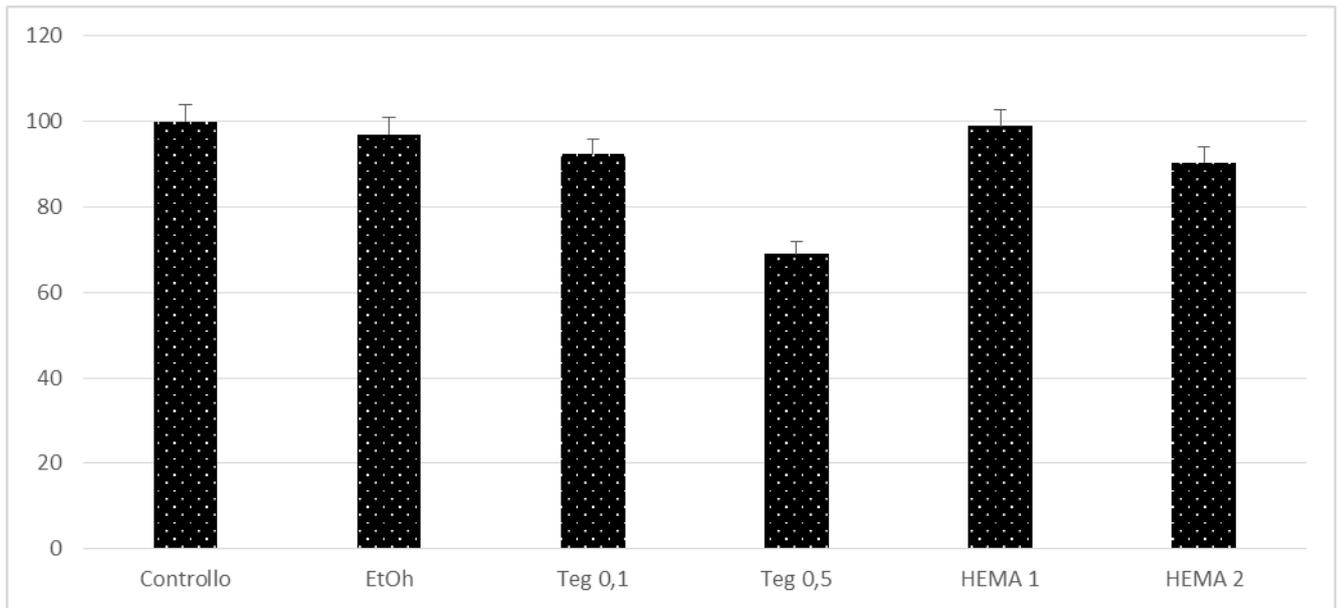


Fig 1b Test di citotossicità in HPCs trattate con le resine a diverse concentrazioni. Il saggio ha reso possibile la scelta delle concentrazioni idonee per la stimolazione delle cellule'

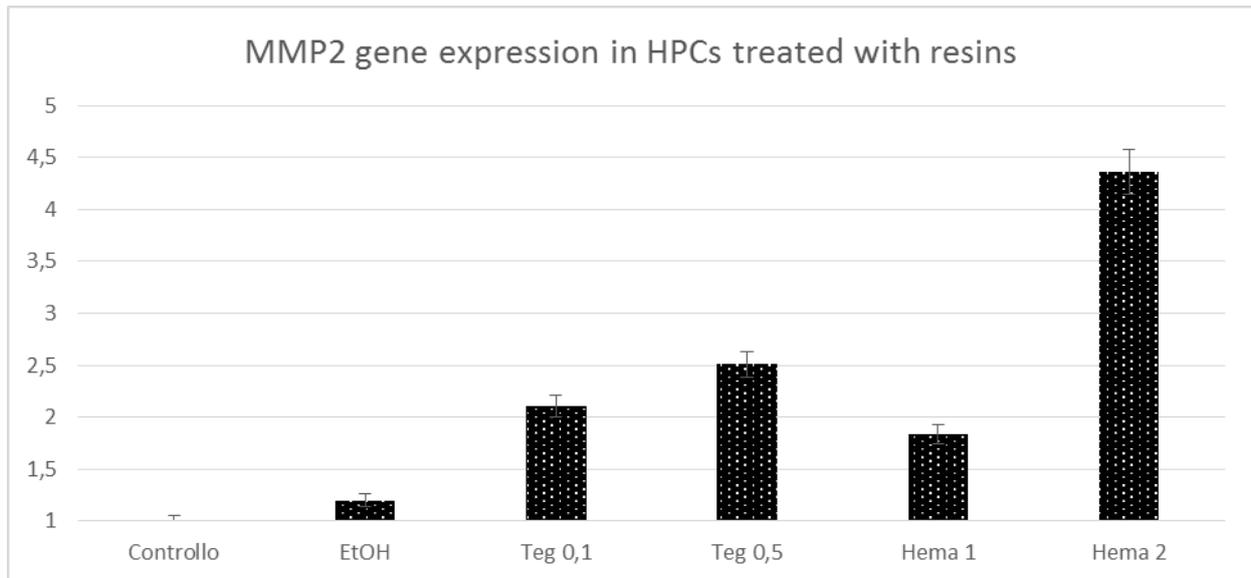


Fig. 2 Variazione dell'espressione genica della MMP2 in HPCs stimolate con TEGDMA ed HEMA per 24h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

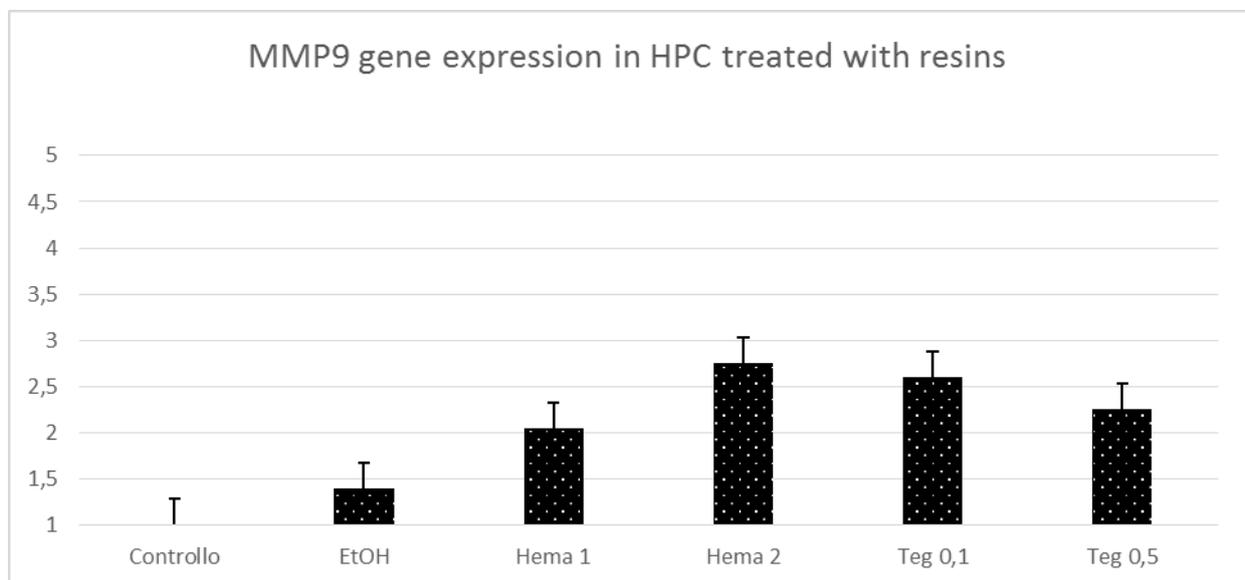


Fig. 3 Variazione dell'espressione genica della MMP9 in HPCs stimolate con TEGDMA ed HEMA per 24h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

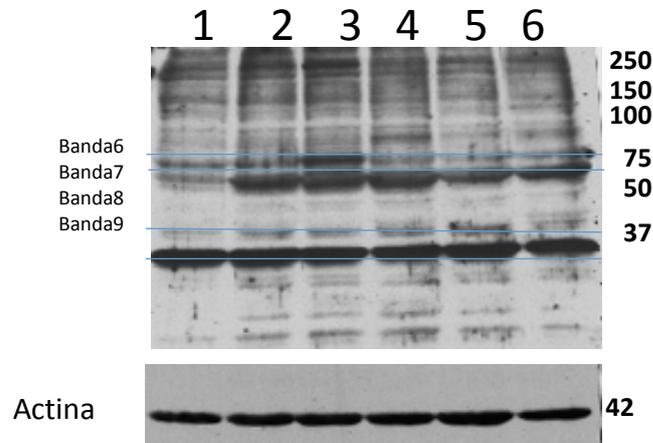


Fig. 4a Espressione della proteina relativa alla MMP2 in HPCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h.

Banda n°7 (da 67KDa): isoforma attiva MMP2.

Banda n°6 (da 72KDa): isoforma inattiva (pro-) MMP2;

1.controllo

2 controllo con etanolo 0,5%

3. Teg 0,1 mM

4. Teg 0,5mM

5. HEMA 1mM

6. HEMA 2mM

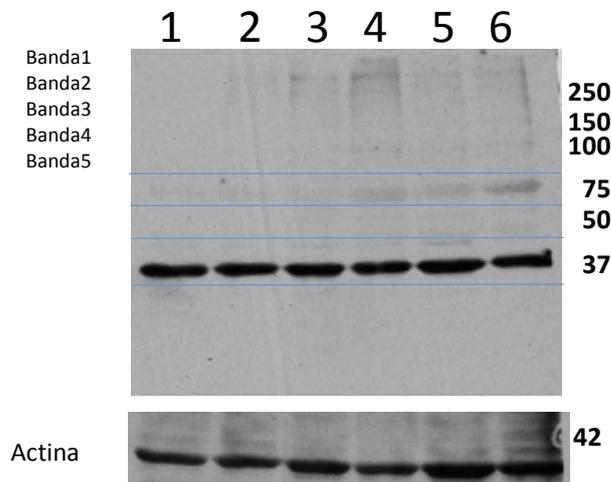


Fig. 4b Espressione della proteina relativa alla MMP9 in HPCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h.

Banda n°7 (da 67KDa): isoforma attiva MMP2.

Banda n°6 (da 72KDa): isoforma inattiva (pro-) MMP2;

1.controllo

2 controllo con etanolo 0,5%

3. Teg 0,1 mM

4. Teg 0,5mM

5. HEMA 1mM

6. HEMA 2mM

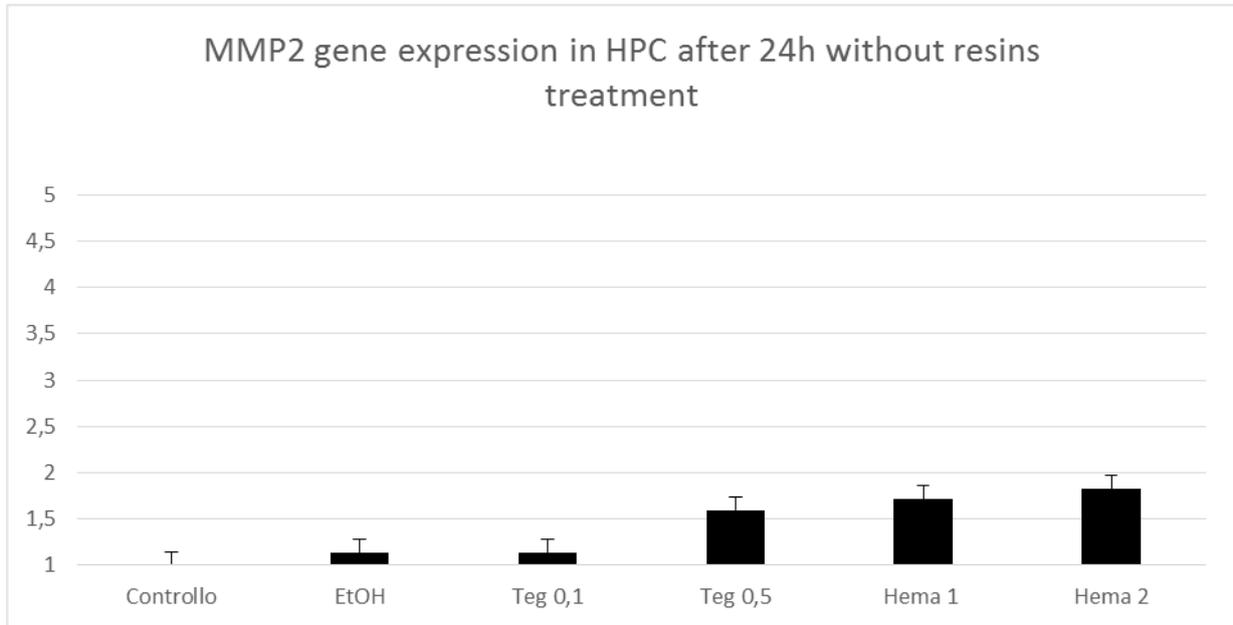


Fig. 5 Variazione dell'espressione genica della MMP2 in HPCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h e successivamente trattando le stesse cellule con mezzo di coltura senza resine per ulteriori 24h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

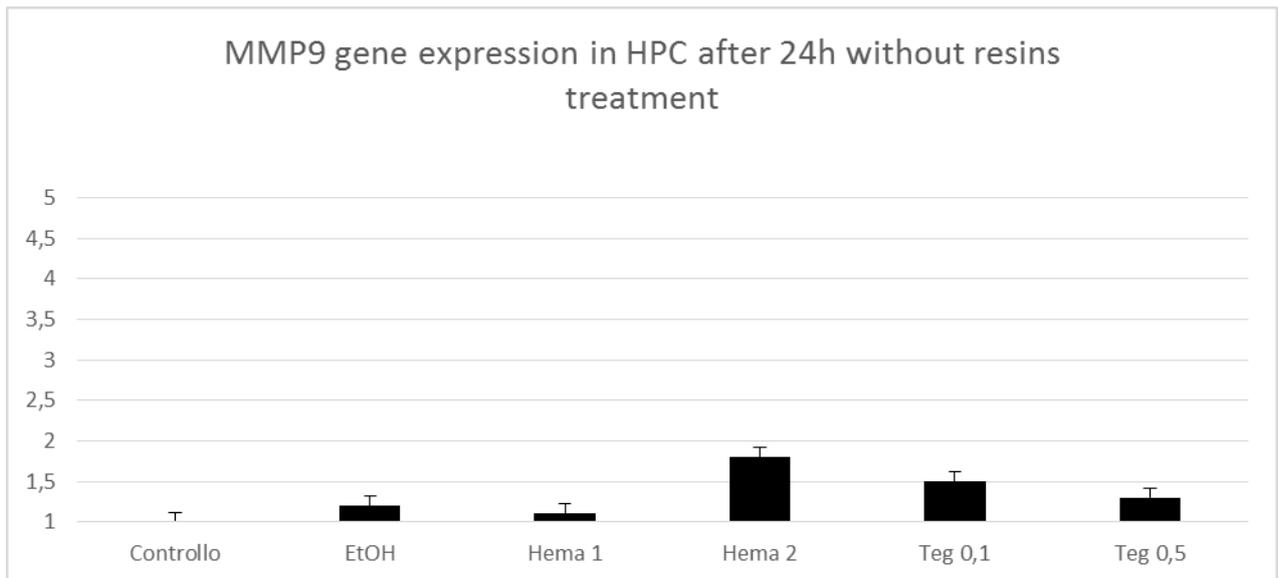


Fig. 6 Variazione dell'espressione genica della MMP9 in HPCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h e successivamente trattando le stesse cellule con mezzo di coltura senza resine per ulteriori 24h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

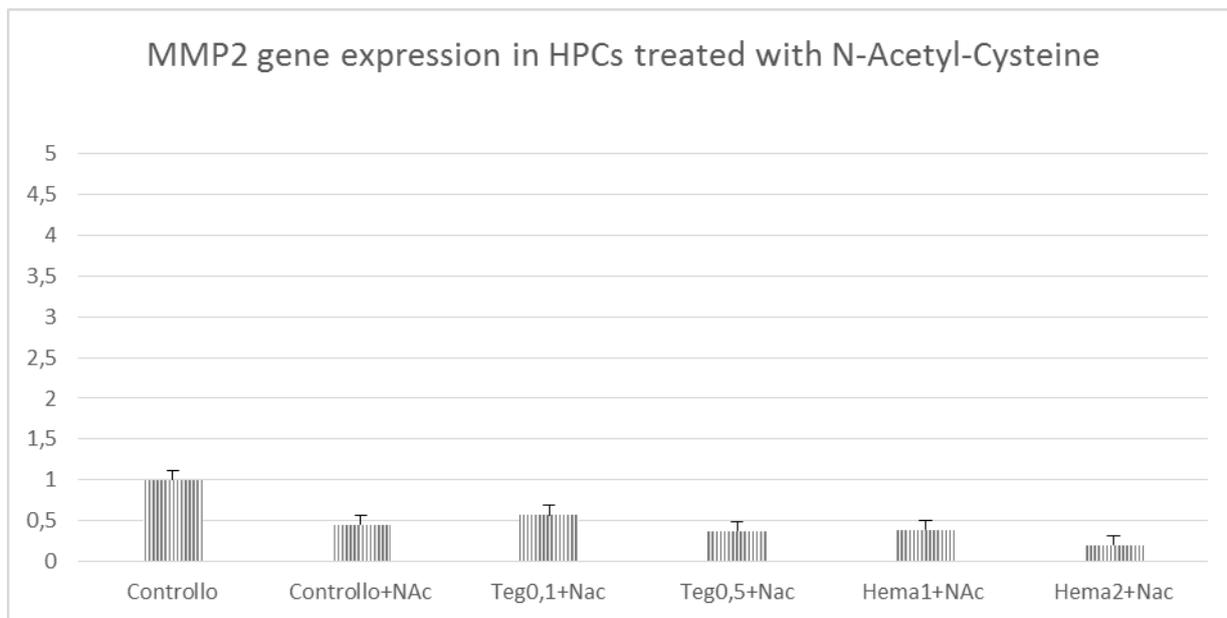


Fig. 7 Variazione dell'espressione genica della MMP2 in HPCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h e successivamente trattando le stesse cellule con con NAC per 2h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

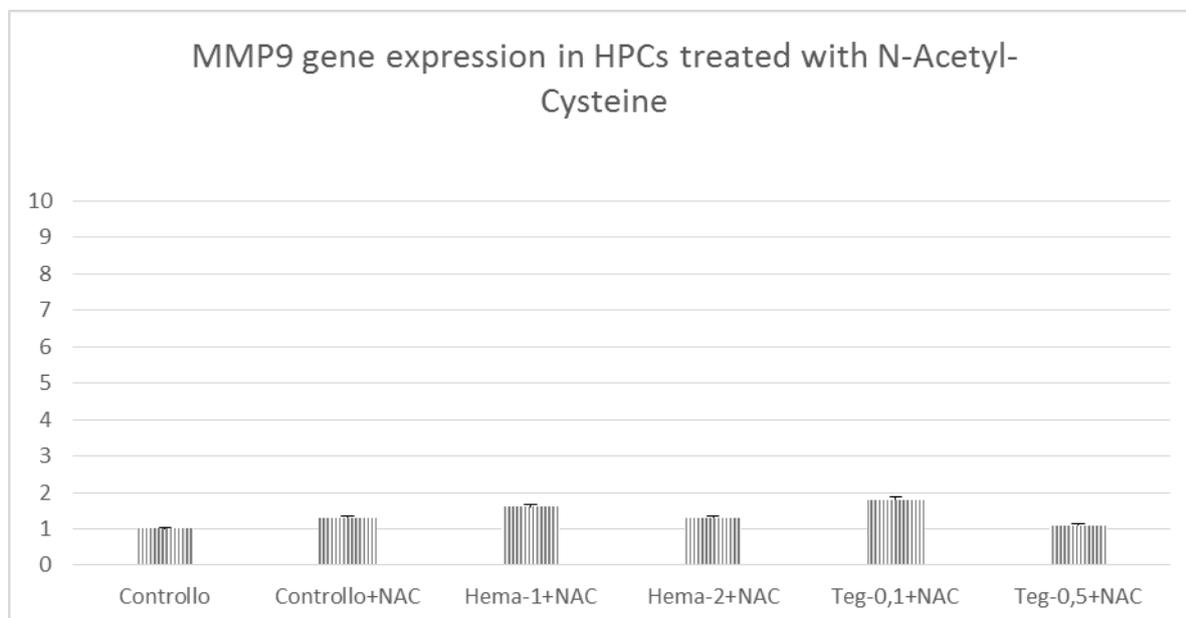


Fig. 8 Variazione dell'espressione genica della MMP9 in HPCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h e successivamente trattando le stesse cellule con con NAC per 2h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

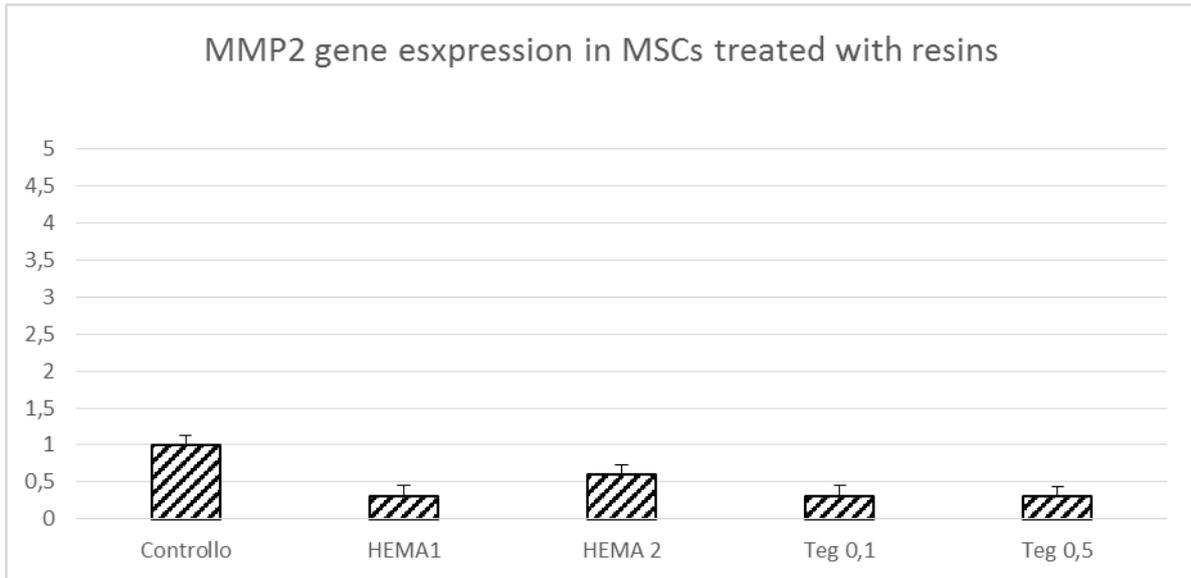


Fig. 9 Variazione dell'espressione genica della MMP2 in MSCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

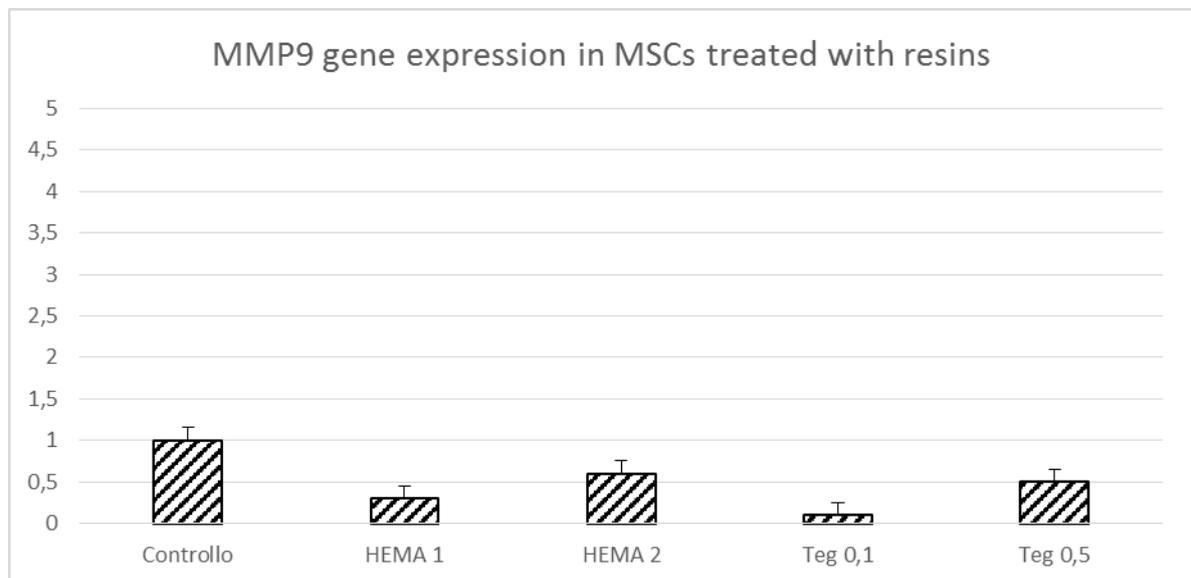


Fig. 10 Variazione dell'espressione genica della MMP9 in MSCs stimulate con TEGDMA ed HEMA per 24h. Il grafico mostra il risultato della media di 5 esperimenti ($p < 0,01$)

5. DISCUSSIONE

I recenti progressi fatti nell'ambito degli studi in vitro sulla tossicologia dei monomeri dentari, discussi in questa tesi, hanno aperto nuovi aspetti per comprendere i rischi a cui sono sottoposti i tessuti del cavo orale e quello pulpare in determinate condizioni fisiologiche e cliniche. Vari parametri come lo spessore, la permeabilità e la zona di dentina trattata sono di particolare importanza per la diffusione dei monomeri attraverso la dentina e possono modificare il grado di tossicità dei monomeri verso il tessuto pulpare (Pashley and Matthews, 1993; Hume and Gerzina, 1996; Mjor and Ferrari, 2002; Galler et al, 2005).

L'identificazione dei pathway di sopravvivenza modificati da TEGDMA ed HEMA può essere di particolare rilevanza clinica (Spagnuolo et al. 2004a; Spagnuolo et al., 2004b). Infatti le alterazioni dei segnali intracellulari (PI-3 kinase e NF- κ B pathway), causate dai monomeri dentari, a livello delle cellule pulpari potrebbe essere la base per una discussione più ampia sul ruolo dei monomeri nella alterazione della struttura e funzione delle cellule del complesso pulpare (Goldberg and Smith, 2004). Le ultime scoperte sull'effetto dei monomeri a livello molecolare, fa supporre che i vari pathways di trasduzione del segnale implicati in processi fisiologici pulpari fondamentali come la dentinogenesi, la guarigione del tessuto pulpare e la risposta infiammatoria, potrebbero essere alterati dai monomeri stessi. Dunque, i monomeri, influenzando i pathways intracellulari, potrebbero modificare l'effetto di molecole regolatorie come growth factors, e quindi di conseguenza la normale omeostasi di un tessuto quale quello pulpare. Pertanto, sebbene non è ancora chiara la relazione tra il grado di danno cellulare tollerato dagli odontoblasti e la loro sopravvivenza, la concentrazione di monomero nella polpa potrebbe essere sufficiente da alterare i normali processi di riparazione quali la regolazione della dentinogenesi di reazione (Smith et al., 1995; Smith et al., 2001). Inoltre la possibilità che i monomeri a concentrazione sub-tossiche, pur non dando un danno diretto, possano influenzare le normali risposte cellulari, fa pensare che a lungo termine le cellule del tessuto pulpare

possono essere più suscettibili a stimoli secondari (e.g. termici o batterici) normalmente non letali. Ovviamente il verificarsi di questi processi è ancora più probabile quando i materiali a base resinosa, quali adesivi, vengono applicati in cavità profonde (Murray et al., 2002; Mantellini et al., 2003).

I nostri risultati mostrano, per la prima volta, il ruolo svolto dalle resine monomeriche come potenziali induttori della regolazione genica. I nostri risultati dimostrano che i monomeri dentari regolano l'attività genica delle metalloproteinasi -2 e -9, in particolare nelle HPCs, sia MMP2 che MMP9 risentono della concentrazione del TEGDMA, al contrario l'espressione dei due geni è aumentata con l'HEMA ma non si evidenzia un fenomeno concentrazione dipendente. Questo lascia supporre che l'utilizzo di sistemi riparativi a base di resine monomeriche, utilizzate quando un insulto si realizza nella dentina, (carie ad esempio), determina il passaggio dalla forma inattiva delle MMPs a quella attiva; in questo contesto il signaling chimico arriva al nucleo delle cellule pulpari determinando una iperespressione dei geni delle due metalloproteinasi con conseguente incremento della trascrizione e della traduzione dell'RNA sia della MMP2 che della MMP9. In quest'ottica possiamo ipotizzare che questo meccanismo intervenga con finalità protettive della dentina già danneggiata. In dettaglio un insulto potrebbe attivare le MMPs con lo scopo di arginare il sito danneggiato e contestualmente attivare i sistemi rigenerativi della dentina posti in essere dagli odontoblasti. Ipotizziamo inoltre che questo meccanismo coinvolga cellula della polpa già differenziate cioè è avvalorato dai risultati ottenuti stimolando le cellule staminali mesenchimali con TEGDMA ed HEMA, infatti non abbiamo apprezzato variazioni nell'espressione dei geni delle due MMPs, questo ci fa ritenere che l'azione delle resine pro-inducente, non agisca come sistema di regolazione della differenziazione di MSCs in cellule della polpa (fibroblasti pulpari o odontoblasti).

Sulla base dei nostri risultati possiamo quindi considerare che l'utilizzo delle resine monomeriche determina un attivazione delle MMPs che nel tempo causa il fallimento del trattamento riparativo. Questo stimola la ricerca di sistemi e trattamenti da

utilizzare nella pratica clinica odontoiatrica, che possano aiutare a perfezionare i trattamenti al fine di ottimizzare i trattamenti. Probabilmente lo studio di molecole capaci di mitigare l'azione del TEGDMA ed HEMA può rappresentare un valido sistema di intervento. Per esempio i nostri dati dimostrano che la regolazione dei geni MMP2 e MMP9, in cellule pulpari stimulate prima con le resine monomeriche per 24h e poi con N-acetil-cisteina per 2h, subiscono una downregulation.

In conclusione comprendiamo quindi che il vero fine dello studio della biocompatibilità dei materiali dentari non è solo quello di accertare la sicurezza di una nuove molecole o di determinati prodotti commerciali, ma soprattutto quello di comprendere e sfruttare i meccanismi cellulari di risposta a sostanze estranee per indirizzare la ricerca verso la progettazione di materiali sempre più biocompatibili non solo in quanto “meno tossici”, ma anche in quanto capaci di interagire in maniera “positiva” con i tessuti ospiti, favorendone la guarigione (grazie all'incorporazione di molecole biomimetiche) o la rigenerazione.

6. REFERENCES

- Ahmed AK, Haylor JL, El Nahas AM, Johnson TS, 2007. Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. *Kidney Int.* 71(8):755-63.
- Ali S, Mann DA. Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochem Funct* 2004;22:67-79.
- Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2004;3:1109-1115.
- Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004;382:393-409.
- Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004;337:1-13.
- Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:47-60.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 1996;22:244-248.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003;7:249-257.
- Catania JM, Chen G, Parrish AR, 2007. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(3):F 905-11.
- 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;26:745-753.
- Cheng S, Lovett DH, 2003. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol.* 162(6):1937-49.
- Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, et al. The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand* 2000a;58:217-228.

- Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000b;108:59-69.
- Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 2003;22:5885-5896.
- Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:177-182.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
- Djavaheiri-Mergny M, Javelaud D, Wietzerbin J, Besancon F. NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Lett* 2004;578:111-115.
- El-Nahas AM, 2003. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int.* 64(5):1553-63.
- Engelberg D. Stress-activated protein kinases-tumor suppressors or tumor initiators? *Semin Cancer Biol* 2004;14: 271-282.
- Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;63:746-751.
- Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, et al. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2004;25:4573-4580.
- Feinendegen LE. Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol* 2002;21:85-90.
- Fullmer HM, Gibson WA, Lazarus G, Stam AC Jr. Collagenolytic activity of the skin associated with neuromuscular diseases including amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 1966 May 7;1(7445):1007-9.
- Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod* 2005;31:396-9.

- 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* 1998a;41:474–80.
- Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res* 1998b; 77:2012–9
- Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:333-355.
- Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res* 2001;80:2046-2050.
- Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:13-27.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109 Suppl:S81-96.
- Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 2002;14:879-897.
- Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:969-977.
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 1991;70:1450-1455.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 2003;116: 4077-4085.
- Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, et al. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J* 2003;22:3356-3366.
- Hebling J, Giro EM, Costa CA. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent* 1999;27:557-564.
- Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:172–179.

Inkinen KA, Soots AP, Krogerus LA, Lautenschlager IT, Ahonen JP, 2005. Fibrosis and matrix metalloproteinases in rat renal allografts. *Transpl Int.* 18(5):506-12.

Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003;82:814-818.

Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res* 1995;74:1162-1167.

Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3:221-227.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Zhi-Wei L. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 301-310.

Katsuno K, Manabe A, Itoh K, Nakamura Y, Wakumoto S, Hisamitsu H, et al. Contact dermatitis caused by 2-HEMA and GM dentin primer solutions applied to guinea pigs and humans. *Dent Mater J* 1996;15:22-30.

Kern JC, Kehrer JP. Free radicals and apoptosis: relationships with glutathione, thioredoxin, and the BCL family of proteins. *Front Biosci* 2005; 10:1727-738.

Kyosseva SV. Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol* 2004;59: 201-220.

Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, et al. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 2004;378(Pt2):373-382.

Lefevre M, Bourd K, Loriot MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A, et al. TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004;83:914-919.

Lehman N, Debret R, Romeas A, Magloire H, Degrange M, Bleicher F, Sommer P, Seux D. Self-etching increases matrix metalloproteinase expression in the dentin-pulp complex. *J Dent Res.* 2009 Jan;88(1):77-82

Luchsinger JA, Mayeux R. Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2004;3: 579-587.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.

- Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003;82:592–596.
- Mathers J, Fraser JA, McMahan M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp* 2004;71:157-176.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004;430: 631-639
- McCawley LJ, Matrisian LM, 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore *Curr Opin Cell Biol.* 13(5):534-40.
- Mjor IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int* 2002;33:35-63.
- Michelsen VB, Lygre H, Skalevik R, Tveit AB, Solheim E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 2003;111:263-271.
- Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1231-1242.
- Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Cavity remaining dentin thickness and pulpal activity. *Am J Dent* 2002;15, 41-46.
- Mott JD, Werb Z, 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 16(5):558-64
- Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 2003;299:214-215.
- Niki E, Noguchi N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc Chem Res* 2004;37:45–51.
- Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res* 2002;81:265-269.

- Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H. Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF- α secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater* 2003;19:101-105.
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 2002;36:617-656.
- Paranjpe A, Bordador LC, Wang MY, Hume WR, Jewett A. Resin monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) is a potent inducer of apoptotic cell death in human and mouse cells. *J Dent Res* 2005;84:172-177.
- Pashley DH. The dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res* 1985;64(Spec Iss):613-620.
- Pashley DH, Matthews WG. The effects of outward forced convective flow on inward diffusion in human dentine in vitro. *Arch Oral Biol* 1993;38:577-582.
- Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int* 1993;24:618-631.
- Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, et al. Ferritin heavy chain upregulation by NF- κ B inhibits TNF α -induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 2004;119:529-542.
- Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13422-13429.
- Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O'Sullivan MI. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endod J* 2002;35:47-55.
- Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995;74:1602-6.
- Reichl FX, Durner J, Kehe K, Manhart J, Folwaczny M, Kleinsasser N, Hume WR, Hickel R. Toxicokinetic of HEMA in guinea pigs. *J Dent* 2002;Sep-Nov;30(7-8):353-8
- Rosati P, Colombo R, 1997. Tessuti di origine mesenchimale. In: Rosati P, Colombo R, I tessuti, Edi-Ermes, Milano, 95-135.

Sagrasta ML, Garcia AE, Africa De Madariaga M, Mora M. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2002;36:329-340.

Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, et al. NF- κ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 2003;22:3898-3909.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.

Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:136-151.

Schafer TE, Lapp CA, Hanes CM, Lewis JB, Wataha JC, Schuster GS. Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. *J Biomed Mater Res* 1999;45:192-197.

Schweikl H, Schmalz G. Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res* 1999;438:71-78.

Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 1998;106(2 Pt 2):696-706.

Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M. NF- κ B: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 2004;5:1348-1358.

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.

Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res* 1998;415:119-130.

Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001;80:1615-1620.

Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, et al. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 2005;26:4111 – 4118.

Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect* 1999;107 (Suppl 1):5-24.

Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1387-1404.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39, 273-280.

Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *J Dent* 2001;29, 341-346.

Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Turto H, Lindy S. A trypsin-like protease from *Bacteroides gingivalis*: partial purification and characterization. *J Periodontal Res*. 1987 Sep;22(5):375-80.

Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*. 1988 Nov;23(6):386-93.

Sorsa T, Tjaderhamne L and Salo T. Matrix metalloproteinases in oral disease. *Oral Disease* 2004, 311-318

Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H, et al. NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 2004a;83:837-842.

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* 2004b;83:703-707.

Spagnuolo G, D'Antò 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* (in press).

Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent* 1998;26:137-45.

Stanislowski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin 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* 2003;66A:476-482.

Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, Tjäderhane L. *J Dent Res.* 2001 Jun;80(6):1545-9. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats.

Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 2003; 15:455-462.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* **1998** Aug; 77(8):1622-9.

Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs).. *Adv Dent Res.* 2001 Aug; 15:55-8. Review.

Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 2003;17:287-296.

Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:77-104. Review

Visse R, Nagase H, 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2;92(8):827-39.

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;49:125-131.

Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicolog Sci* 2004;78:3-14.

Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000;203(Pt 8):1253-1263.

West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 2002;5:234-248.

Yamamoto Y, Gaynor RB Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med* 2001;1:287-296.

Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:863-73

Zhang Y, Chen F. Reactive oxygen species (ROS), troublemakers between nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK). *Cancer Res* 2004;64:1902-1905.

Zhivotovsky B. Apoptosis, necrosis and between. *Cell Cycle* 2004;3:64-66.