

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
MORFOLOGICHE UMANE E MOLECOLARI**

SETTORE DISCIPLINARE BIO/16

**ANALISI MORFOLOGICA E MOLECOLARE DI
CELLULE DA COLTURE PRIMARIE UMANE
ESPOSTE A RESINE BIOCAMPATIBILI**

Presentata da: Dott.ssa Michela Zago

Coordinatore:

Chiar.mo Prof.

Lucio Cocco

Relatore:

Chiar.mo Prof.

Giovanni Mazzotti

1. INTRODUZIONE	4
1.1 <i>I Compositi Resinosi o Resin-Based Dental Materials(RBDM)</i>	4
1.2 <i>Processi di biodegradazione dei polimeri.....</i>	6
1.3 <i>Cos'è la Biocompatibilità?.....</i>	9
1.4 <i>La Matrice Extracellulare (ECM)</i>	13
1.4.1 <i>Principali molecole proteiche della ECM</i>	14
2. SCOPO DELLA RICERCA	31
3. MATERIALI E METODI.....	33
3.1 <i>Colture di fibroblasti umani di gengiva e polpa</i>	33
3.2 <i>Trattamento con il monomero resinoso HEMA.....</i>	34
3.3 <i>Saggio di vitalità cellulare</i>	34
3.4 <i>Analisi morfologica cellulare delle HGFs con il FEISEM</i>	35
3.5 <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	36
3.6 <i>Immunofluorescenza per il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina</i>	37
3.7 <i>SDS-PAGE e Western Blotting per pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina</i>	39

3.8 Controlli	40
3.9 Analisi Statistica.....	41
4. RISULTATI	42
4.1 Saggio di vitalità cellulare	42
4.2 Analisi al FEISEM.....	45
4.3 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	49
4.4 Immunofluorescenza per il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina	49
4.5 SDS – PAGE e Western Blotting per il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina	54
5. DISCUSSIONE.....	58
6. BIBLIOGRAFIA	67

1. INTRODUZIONE

1.1 I Compositi Resinosi o Resin-Based Dental Materials (RBDM)

Il ripristino degli elementi dentari compromessi viene effettuato con biomateriali sintetici, cioè sostanze biologiche che interagiscono con i tessuti naturali. Fino a pochi anni or sono, il materiale più frequentemente utilizzato per le otturazioni dei molari e premolari era costituito dall'amalgama d'argento, una polvere costituita dal 52% di Mercurio ed il 48% da una lega a base di Argento (16%), Stagno (26%), Rame (5%) e Zinco (1%) (Innes and Youdelis, 1963; Mahler, 1997). Una dose moderna di amalgama contiene circa 440mg di Mercurio e 400mg di lega. Un'otturazione con amalgama rilascia ogni giorno da 0.5 a 0.10mg di Mercurio (Chan and Svare, 1972; Svare et al., 1973; Boyer, 1988; Ahmad and Standard, 1990) per fenomeni di abrasione, corrosione, disgregazione elettrolitica generati dai diversi metalli in ambiente salino come nella cavità orale; anche i sali dei cibi, le acque gassate, gli acidi alimentari, ecc. accentuano la naturale disgregazione delle amalgame. I metalli rilasciati per il 50% si depositano nei tessuti cellulari inibendo processi enzimatici e metabolici del nostro corpo; l'altro 50% viene eliminato attraverso le urine e le feci (Jokstad et al., 1992) e va ad inquinare l'ambiente in cui viviamo, il terreno e quindi lo ritroviamo anche nella frutta, i cibi, le verdure, ecc. e nelle falde acquifere (Jones, 1999; Spencer, 2000). Da qualche anno l'alternativa a tale materiale è costituita, per ora, dalle resine composite, dalla ceramica e dall'oro, che permettono, oltre a migliorare l'estetica, anche l'esecuzione di cavità più conservative (Craig, 1997; Mackert and Wahl, 2004); sempre a patto che tali

resine composite vengano utilizzate con l'ausilio della diga di gomma ovvero di un foglio di gomma, posto in bocca del paziente, che ha lo scopo di non far bagnare i denti da trattare dalla saliva (la saliva inibisce infatti il processo di indurimento di tali materiali minandone la resistenza nel tempo).

Esistono diversi tipi di compositi resinosi attualmente utilizzati in odontoiatria conservativa, tutti costituiti da tre principali componenti: matrice resinosa organica; riempitivo inorganico (vetro) e l'agente accoppiante (silano) (Craig, 1997). La matrice resinosa organica è la componente chimicamente attiva del composito. Inizialmente si trova sotto forma di monomero fluido, successivamente viene convertita in polimero rigido attraverso la reazione comunemente definita polimerizzazione (Santerre, 2001). Il monomero normalmente utilizzato è il bisfenoloA-diglicidil-dimetacrilato (*Bis-GMA*), detto anche, Resina di Bowen; in alcuni casi viene usato l'urtano-dimetacrilato (*UDMA*). Sono presenti in queste miscele resinose anche molecole utilizzate come regolatori della viscosità quali il metilmetacrilato (*MMA*), trietilen-glicol-dimetacrilato (*TEGDMA*), 2-idrossietil-metacrilato (*HEMA*), ecc... Infine vengono aggiunti degli inibitori della polimerizzazione (come l'idrochinone, per evitare che polimerizzi prima del dovuto) e, poi, un attivatore della polimerizzazione (per far sì che il composito polimerizzi al momento giusto), come ad esempio il canforochinone (*CQ*). Il riempitivo organico è un vetro costituito da alluminosilicato, le cui funzioni sono: migliorare le proprietà meccaniche, modulare le proprietà estetiche, ridurre la contrazione da polimerizzazione (diminuisce la quantità di resina), ridurre il coefficiente di espansione termica e conferire radiopacità. Infine l'agente accoppiante è un silano, cioè una molecola con due gruppi funzionali rappresentati da un gruppo polare -OH attratto dai gruppi -OH presenti sulla superficie del riempitivo; e da un

gruppo non polare (metacrilato) in grado di reagire con la resina attraverso il legame C=C. Il ruolo del silano è quindi quello di legare tra di loro due materiali non affini, come la matrice idrofoba e il riempitivo idrofilo (Van Landuyt et al., 2007).

Queste resine composite, per poter agire come protettivi sulla superficie del dente, debbono essere foto polimerizzate, dopo la loro applicazione. La foto polimerizzazione avviene mediante l'utilizzo di una luce rappresentata da una particolare lunghezza d'onda, che permette ai monomeri, costituenti la resina, di interagire tra loro e formare i cosiddetti polimeri. Ciò è reso possibile da una molecola che agisce come foto attivatore. In gran parte dei prodotti questa molecola è rappresentata dal Canforochinone (CQ) (Yoshida and Greener, 1993).

In quest'ultimi anni si è cercato di migliorare le caratteristiche fisico-chimiche dei materiali da restauro allo scopo di renderli, non solo il più estetici possibile, ma soprattutto maggiormente biocompatibili.

1.2 Processi di biodegradazione dei polimeri

Esistono diversi processi mediante i quali i materiali possono essere degradati (Coury, 1996) e alcuni dei più comuni sono elencati nella tabella sottostante.

TABLE 1	
Polymer Degradation Processes	
Physical Processes	Chemical Processes
A. Material loss or uptake	A. Thermolysis
Sorption	Scission reactions generating radicals
Dissolution	Depolymerization
Mineralization	
Extraction	B. Oxidation
	Chemical
	Thermo-oxidative
B. Physical changes	
Swelling	
Softening	C. Solvolysis
Crystallization	Hydrolysis
Decrystallization	Alcoholysis, etc.
Stress cracking	
Fatigue fracture	D. Photolysis
Impact fracture	
Wear	E. Radiolysis

La degradazione chimica che avviene all'interno della cavità orale, definita anche "biodegradazione", è associata a diversi meccanismi, inclusi l'idrolisi chimica mediata dalla saliva (Kao, 1989; Mair, 1991) e quella mediata dagli enzimi (Munksgaard and Freund, 1990), e dalle variazioni di pH (Lefebvre et al., 1995). Il corpo umano è un ambiente acquoso altamente aggressivo, la cui temperatura è stabilizzata a 37°C ed il cui pH è mantenuto ad un valore medio pari a 7.4. All'interno della bocca, i processi di biodegradazione sono reazioni molto complesse che includono la disintegrazione e la dissoluzione dei materiali impiantati, reazioni causate dalla stessa saliva, soluzione salina che rappresenta un eccellente elettrolita e che facilita i meccanismi di corrosione sia di tipo elettrochimico che di tipo idrolitico, e da altri tipi di degradazione chimico/fisica, come ad esempio l'erosione e l'usura, dovuti al cibo introdotto, alla masticazione ed alla attività batterica (Santerre et al., 2001).

I batteri, infatti, sono in grado di generare diversi enzimi di natura proteolitica ed idrolitica (Foto et al., 1990), con una vasta gamma di sotto prodotti metabolici (Schuster, 1990), i quali possono avere potenziali effetti sull'integrità strutturale dei materiali da restauro con eventuale rilascio di prodotti tossici nell'ambiente in cui sono stati applicati. L'azione idrolitica di questi enzimi varia moltissimo, in quanto è stato osservato che i livelli e i tipi di enzimi possono variare da un individuo ad un altro, a seconda inoltre delle condizioni cliniche degli stessi organismi. Ad esempio, diversi studi hanno trovato delle associazioni tra l'attività enzimatica salivare e le malattie periodontali (Genco and Slots, 1984; Zambon et al., 1985).

Sono, inoltre, presenti nei tessuti, numerose molecole e cellule con la capacità di catalizzare determinate reazioni chimiche o di isolare, attaccare e distruggere rapidamente i corpi estranei. Numerose cellule, infatti, incluse quelle coinvolte nei processi infiammatori, producono enzimi che catalizzano alcune reazioni degradative con conseguente alterazione della struttura molecolare dei materiali impiantati. Alcune cellule immunitarie specifiche (come i fagociti) migrano verso le zone coinvolte nei fenomeni di irritazione ed infiammazione richiamati dalla presenza di questi corpi impiantati, e si adsorbono sulla loro superficie riconosciuta come estranea da proteine del corpo come ad esempio gli anticorpi. Questo meccanismo ha come conseguenza un rapido aumento dell'attività metabolica di difesa dell'organismo ed è responsabile dell'attivazione di processi di degradazione dei materiali polimerici.

Le degradazioni idrolitiche condotte sia dai tessuti stessi che dalla saliva e dagli enzimi (es. le esterasi) possono durare per un lungo periodo di tempo (Freund and Munksgaard, 1990), causando il rilascio dei singoli componenti, quali i monomeri, in quantità comprese nel range tra microgrammi e milligrammi

(Spagnuolo et al., 2006) e queste stesse quantità liberate sono state ritenute responsabili di diversi effetti citotossici e metabolici (come ad esempio la sensibilità dei denti) (Unemori et al., 2001), effetti immunologici locali (Jontell et al., 1995) a reazioni infiammatorie di tipo cronico della polpa di dente umana (Costa et al., 2000, 2003a,b). Alcuni studi hanno evidenziato che questo rilascio di monomeri ha un valore elevato, subito dopo la polimerizzazione dei compositi, e diminuisce con il passare del tempo (Çetingüç et al., 2007). Tuttavia effetti tossici sul metabolismo cellulare sono stati riscontrati anche dopo 160h dalla polimerizzazione (Bouillaguet et al., 1996).

I vari studi basati sulla degradazione dei diversi polimeri resinosi hanno evidenziato il rilascio, in particolar modo, di due monomeri che fanno parte principalmente di questi compositi: l'HEMA ed il TEGDMA (Goldberg et al., 1994; Gerzina and Hume, 1995; Bouillaguet et al., 1996).

1.3 Cos'è la Biocompatibilità?

Nell'ultimo ventennio, la crescita ed il perfezionamento dei biomateriali sono stati considerevoli e costanti ed hanno avuto importanti riscontri clinici in diverse discipline mediche, in modo particolare nell'odontoiatria, nell'ortopedia e nella chirurgia cardiovascolare. Lo sviluppo e l'utilizzo di dispositivi sempre più complessi per la prevenzione, la diagnosi e la terapia è senza dubbio uno dei fattori di prolungamento e miglioramento della qualità della vita nei paesi occidentali. Per questo motivo la domanda di dispositivi medici sicuri ed efficaci, in poche parole *biocompatibili*, è crescente e, di conseguenza, il loro mercato è in espansione.

Con il termine di *biocompatibilità* si fa riferimento ad un parametro che indica la compatibilità dei materiali lavorativi e dei dispositivi nei confronti dei tessuti e dei fluidi corporei. Essa risulta perciò essere di notevole importanza in ambito farmacologico e in ambito biomedico, nella produzione di materiali che vengono ad esempio usati per la costruzione di protesi, quali il titanio e l'idrossiapatite. Questi materiali devono perciò presentare una totale biocompatibilità nei riguardi dell'organismo umano in cui vengono impiantati, in quanto non solo non devono essere dannosi, ma devono anche non essere attaccati dalle proteine dell'organismo, causando quindi una risposta immunitaria. La citotossicità dei biomateriali dentari è stata ampiamente dimostrata in passato, ma le risposte cellulari legate allo stress citotossico o genotossico indotte dai monomeri che compongono questi biomateriali, sono complesse e ancora lontane dall'essere del tutto conosciute. Negli ultimi trent'anni, l'odontoiatria conservativa è stata caratterizzata da un miglioramento dovuto all'introduzione dei materiali da otturazione estetici, quali i compositi resinosi o RBDM (*resin-based dental materials*). Una delle principali proprietà dalle quali questi materiali non possono prescindere è quindi proprio la *biocompatibilità* (St John, 2007).

Il tema della biocompatibilità e tossicità in odontoiatria conservativa è legato essenzialmente al rilascio dei monomeri e dei reagenti (attivatori, iniziatori, stabilizzatori, inibitori, ecc.), che compongono i materiali stessi. Numerosi studi hanno confermato che i monomeri, come il Bis-GMA, UDMA, i comonomeri come il TEGDMA e l'HEMA o gli iniziatori, come il CQ, vengono liberati dalle resine composite, dai cementi vetroionomerici (GIC) e dagli adesivi dentinali (Geurtsen, 2000; Santerre et al., 2001; Michelsen et al., 2007). Questi monomeri dentari possono essere rilasciati nei tessuti del cavo orale e a

livello dell'interfaccia dente-materiale sia in seguito ad un'incompleta polimerizzazione sia 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 et al., 2002). Dal punto di vista strettamente clinico si deve considerare che i monomeri possono diffondere attraverso i tubuli dentinali in concentrazione sufficiente a determinare un danno pulpale (Bouillaguet et al., 2000; Noda et al., 2002). Il danno biologico pulpale, che può derivare dalla degradazione delle matrici polimeriche e dalla polimerizzazione incompleta dei monomeri, dipende da vari fattori: le proprietà tossiche possedute dalle sostanze liberate; proprietà, come la solubilità, che favoriscono la diffusione del materiale verso la polpa; il tempo e la dose del reagente alle quali è esposta la polpa, i quali devono essere sufficienti a dare una reazione biologica come ad esempio un'infiammazione, ecc.

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, diversi 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 anche effetto simil-estrogenico (Schafer et al., 1999), possono dare reazioni allergiche (Katsuno et al., 1996) o addirittura avere effetto cancerogeno (Schweickl and Schmalz, 1999). Alcuni autori suggeriscono 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'appropriate polimerizzazione del materiale (Geurtsen, 2000). Nello studio della loro biocompatibilità non si deve 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).

Nei primi anni della ricerca biologica sui *RBDM*, l'attenzione è stata posta sulla quantificazione degli effetti citotossici dei materiali compositi o degli adesivi dentali su diverse linee cellulari, andando a valutare differenti parametri biologici, quali il danno alla membrana cellulare, l'inibizione dell'attività enzimatica e della sintesi di proteine e degli acidi nucleici. Una grande attenzione è stata rivolta anche verso l'individuazione delle singole molecole rilasciate dai materiali complessi 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* (Gerzina and Hume, 1995; Spahl et al., 1998). L'*HEMA* viene frequentemente utilizzato in queste resine, in quanto è in grado di competere con l'acqua, nella penetrazione ed infiltrazione all'interno della dentina. Questo monomero, grazie alle sue caratteristiche chimiche, è in grado di diffondere attraverso la dentina e di raggiungere la polpa dentale, un tessuto molto più sensibile, a livello del quale può causare la comparsa di reazioni di ipersensibilità negli individui suscettibili (Pashley, 1996).

E' stato ipotizzato che, dopo l'utilizzo di sistemi adesivi o *bonding*, le concentrazioni raggiunte a livello pulpare dai due monomeri sopracitati, rilasciati attraverso la dentina, possono essere 1.5 - 8mmol/L per l'*HEMA* e 4mmol/L per il *TEGDMA* (Bouillaguet et al., 1996; Noda et al., 2002). E' stato ampiamente confermato che queste concentrazioni sono in grado di causare

numerosi effetti biologici *in vitro*, primo tra tutti una diminuzione della vitalità cellulare (Guertzen, 2000).

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 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.

Pertanto, lo studio delle caratteristiche di una matrice polimerica biologica risulta essere di notevole utilità e importanza. A questo scopo, si effettuano studi su colture di cellule che vengono utilizzate estensivamente per valutare la biocompatibilità di biomateriali potenzialmente impiantabili.

1.4 La Matrice Extracellulare (ECM)

La matrice extracellulare (ECM) non deve essere considerata una struttura statica, ma bensì una zona dinamica, costantemente rimodellata, dove le proteine interagiscono direttamente con i recettori della superficie cellulare, quali le integrine, per dare il via alla trasduzione dei segnali e per modulare la funzione dei fattori di crescita e di differenziazione. Nella ECM si possono distinguere bene i due principali domini che la costituiscono: la membrana basale, uno strato di matrice condensata all'interno del quale troviamo cellule epiteliali adiacenti, ricoperte da un foglietto cellulare di diverse origini: mesoteliali, meningoteliali e sinoviali, e da cellule muscolari e di Schwann e la matrice interstiziale. La caratteristica strutturale principale che riguarda entrambi gli strati e che quindi li

accomuna è rappresentata da una struttura di base costituita da uno scaffold di collagene, costituito da differenti tipi di collagene (Bosman and Stamenkovic, 2003).

Le proteine della matrice extracellulare (ECMPs) sono glicoproteine di adesione, comprendenti laminine e tenascine, e proteoglicani i quali aderiscono allo scaffold ed interagiscono con le cellule adiacenti alla ECM. Le ECMPs, insieme alle molecole di adesione ed alle citochine, regolano le interazioni tra le cellule ed il microambiente, ed anche il differenziamento cellulare e l'architettura dei tessuti normali e neoplastici. La modulazione esercitata dalle molecole di adesione sulle cellule neoplastiche ed immuni, la distribuzione delle ECMPs e la produzione di citochine possono formare un "network" di interazione che contribuisce a regolare la crescita e la differenziazione tissutale sia in condizioni di normalità che durante la trasformazione tumorale.

1.4.1 Principali molecole proteiche della ECM

Il *Collagene* (o collagene) è la principale proteina del tessuto connettivo negli animali e la proteina più abbondante nei mammiferi, rappresentando nell'uomo circa il 6% del peso corporeo ed ha distribuzione ubiquitaria nel corpo umano. Le molecole di natura collagenica sono rappresentate da proteine ubiquitarie responsabili del mantenimento dell'integrità strutturale nei vertebrati e in molti altri tipi di organismi (Myllyharju and Kivirikko, 2001). Esistono numerosissimi tipi di collagene propriamente detto e diverse proteine che hanno struttura polipeptidica largamente assimilabile al collagene. In letteratura sono stati finora descritti 28 tipi di collagene. I più comunemente studiati sono: il collagene di tipo I, che rappresenta il 90% del collagene totale, ed entra nella

composizione dei principali tessuti connettivi, come pelle, tendini, ossa e cornea; il collagene di tipo II, il quale forma la cartilagine, i dischi intervertebrali ed il corpo vitreo; il collagene di tipo III, che riveste una grande importanza nel sistema cardiovascolare. Entra a far parte anche del tessuto di granulazione. Viene prodotto velocemente ed in grandi quantità prima del collagene di tipo I, il quale è più resistente, da cui è successivamente sostituito; il collagene di tipo IV, che va a comporre la membrana basale; seguono poi il collagene di tipo V e VI, che associati a quello di tipo I, vanno a costituire il tessuto interstiziale; ecc...(Bosman and Stamenkovic, 2003). Il Collagene è la proteina più abbondante della matrice extracellulare di cui esistono due classi: il Collagene fibrillare e quello non fibrillare. Solo i collagene di tipo I, II, III, V e XI si auto-assemblano a formare fibrille, strutture a tripla elica di lunghezza approssimativa: 300nm e diametro 1.5nm. La formazione del collagene fibrillare è un processo extracellulare che richiede la rottura del peptide terminale mediante l'intervento di una specifica metalloproteinasi (Hulmes, 2002). Altri collagene, come il tipo IV, VIII e X, vanno a costituire delle vere e proprie reti. Un esempio di rete è la membrana basale della ECM, costituita principalmente da collagene IV (Bosman and Stamenkovic, 2003). L'unità strutturale del collagene è rappresentata dal tropocollagene (o tropocollagene), proteina con una massa molecolare di circa 285 KDa formata da tre catene polipeptidiche con andamento sinistrorso che si associano a formare una tripla elica destrorsa (trans di tipo - 2) (Fig.1). Solitamente, per il collagene di tipo I, sono presenti due catene alfa 1 ed una catena alfa 2. Le tre catene comportano la presenza di un'unità tripeptidica caratteristica del collagene, (Gly-X-Y)_n, che implica quindi la presenza della glicina (Gly) ogni tre residui e dove X e Y sono spesso la prolina (Pro) e l'idrossiprolina (Hyp); i 3 filamenti sono così tenuti insieme da due tipi di legami: legami a idrogeno

e legami crociati tra le molecole di lisina / idrossilisina (Hulmes, 1992; Ottani et al., 2001).

La biosintesi del collagene avviene ad opera di diversi tipi cellulari a seconda del tessuto (ad esempio condroblasti nel tessuto connettivo, osteoblasti nell'osso). Il processo di biosintesi inizia con la trascrizione del gene o dei geni e la maturazione dell'mRNA. Sono presenti sequenze che codificano per lunghi peptidi in eccesso rispetto alle molecole di collagene mature, quindi il collagene nasce come procollagene, prodotto che possiede rispetto al collagene due telomeri, uno N-terminale e uno C-terminale, che hanno struttura globulare. La traduzione avviene nel REG (reticolo endoplasmatico granuloso) e la catena nascente di procollagene subisce rimozione del peptide segnale e idrossilazione di specifici residui di prolina e lisina ad idrossiprolina e idrossilisina (ad opera di idrossilasi, con cofattore essenziale la vitamina C), con la produzione di catene alfa di procollagene. Tre di queste catene si avvolgono a formare una tripla elica, stabilizzata da legami idrogeno tra amminoacidi idrossilati (legami crociati). Quest'elica passa nell'apparato del Golgi dove viene completata la glicosilazione e da qui, attraverso vescicole di secrezione la molecola viene secreta all'esterno. All'esterno della cellula la molecola subisce l'azione di alcune procollagene peptidasi, che tagliano i telomeri trasformando il procollagene in tropocollagene. Le molecole di tropocollagene si dispongono in file parallele a formare fibrille. Le fibrille infine possono disporsi in fasci ondulati o paralleli per formare fibre e le fibre possono formare fasci di fibre. Il processo che porta alla formazione delle fibre del tessuto connettivo è detto *fibrollogenesi* (Pasqualino and Nesci, Utet, 1998).

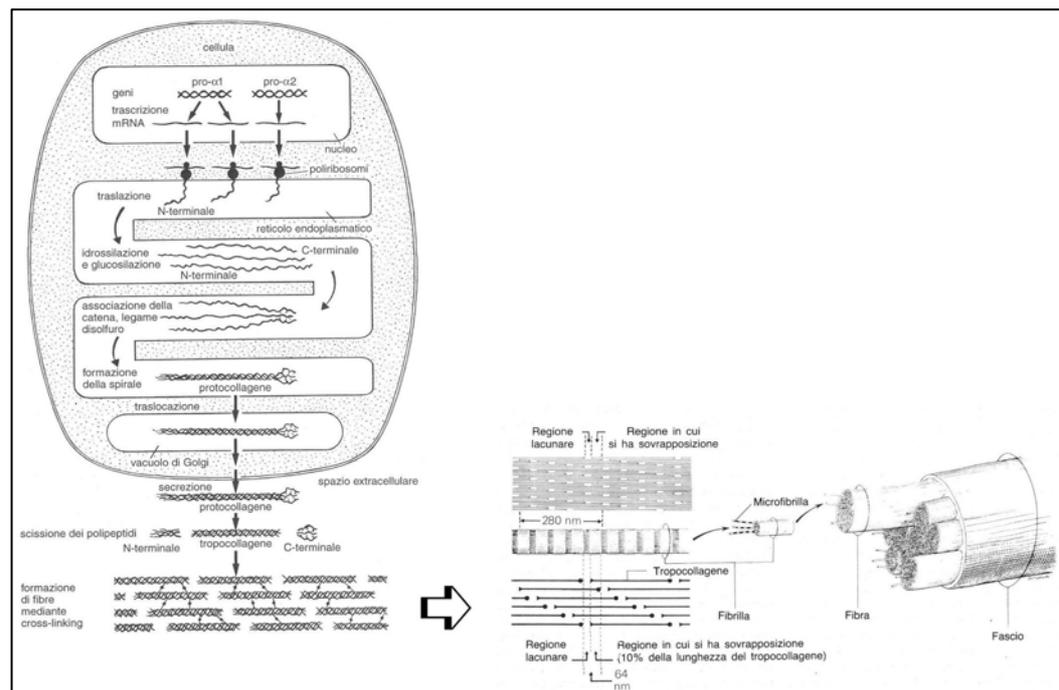


Fig.1: Schema riassuntivo della sintesi del collagene.

Tra le fibre del tessuto connettivo, quelle di collagene sono le più abbondanti, in quanto hanno il compito principale di stabilizzare l'architettura del tessuto stesso (Shuttleworth et al., 1980), grazie alle loro proprietà fisiche, quali la flessibilità e la resistenza alla trazione. La biosintesi del collagene interstiziale, specialmente del collagene di tipo I, risulta essere controllata durante i processi di sviluppo tissutale e durante quelli di guarigione, ma anche in numerose condizioni patologiche, come le malattie fibro-proliferative. Diversi studi di queste malattie hanno mostrato che la sintesi del collagene e la sua deposizione sono influenzate da vari fattori sia di tipo molecolare, come le citochine ed i fattori di crescita, sia di tipo fisico, come le tensioni meccaniche (Gressner and Bachem, 1994; Peltonen et al., 1991).

Le *Laminine*, insieme al collagene di tipo IV, al nidogen ed al perlecan, sono uno dei principali componenti della membrana basale. Questa molecola ha un peso molecolare compreso tra i

200 ed i 400kDa, è composta da tre catene legate tra loro da ponti disolfuro conosciute come $\alpha 1$, $\beta 3$ e $\gamma 2$. Sono state identificate ben 5 catene α , 3 catene β e 3 catene γ (Aumailley and Smyth, 1998; Colognato and Yurchenco, 2000; Miner et al., 1997) (Fig. 2).

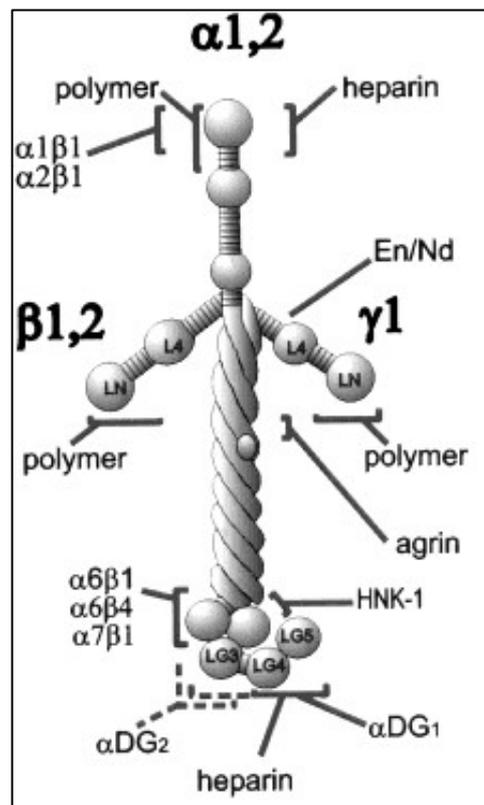


Fig. 2: Struttura della Laminina

Fino ad ora sono state isolate 12 isoforme delle laminine, la cui sintesi avviene in un'ampia varietà di cellule. Inoltre questa molecola sembra avere un numero sorprendente di funzioni ed effetti, riguardanti l'adesione delle cellule, la loro migrazione ed il differenziamento. La maggior parte delle laminine agisce dopo aver riconosciuto e legato il proprio recettore, rappresentato dalle integrine (Fig.3).

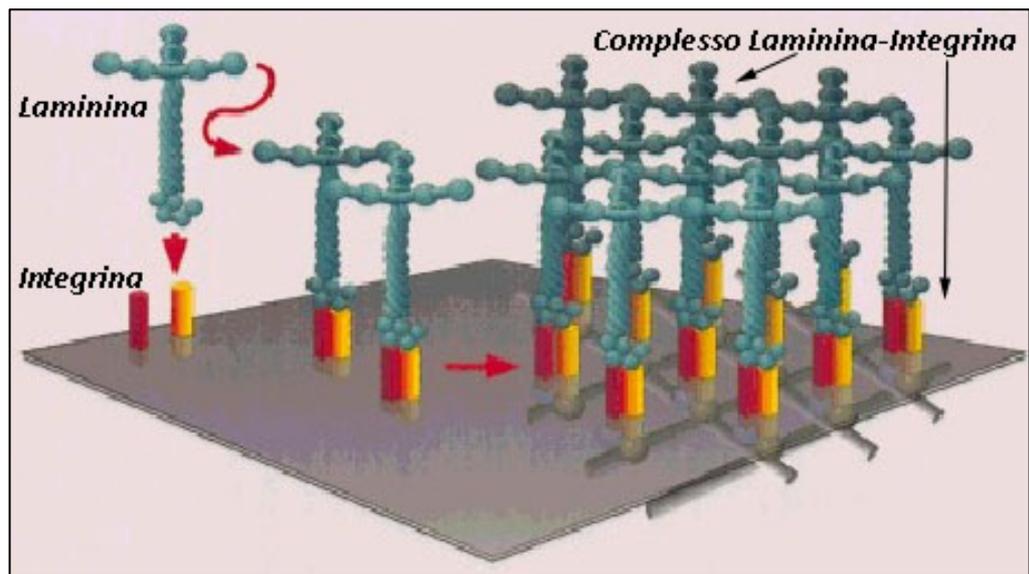


Fig.3: Schema rappresentante l'interazione tra le laminine ed i loro recettori-integrine. E' stato ipotizzato che alle proteine laminine sia necessaria l'interazione con il proprio recettore (ad es. integrine e distroglicani), per potersi assemblare con la membrana basale della ECM (Cognato and Yurchenco, 2000).

Dato l'ampio range di ruoli svolti da queste proteine non deve sorprendere il fatto che siano significativamente coinvolte in una varietà di malattie. Ad esempio il ruolo delle laminine nell'invasione tumorale, nella formazione delle metastasi e nell'angiogenesi è stata ampiamente studiata (Patarroyo et al., 2002).

Le *Fibronectine* (FN) sono proteine appartenenti alla famiglia delle glicoproteine dimeriche; sono abbondanti nella matrice extracellulare e ubiquitarie. Vengono prodotte da diversi tipi di cellule e tessuti, sottoforma di dimero solubile e successivamente assemblate all'interno di fibrille multimeriche insolubili a livello della superficie cellulare. La formazione di un

network di FN fibrillare è un processo molto complesso, tutt'ora studiato da diversi ricercatori. La formazione delle fibrille è cellulo-mediata e dipende dalle interazioni tra le FN ed i loro rispettivi recettori, ad esempio le integrine (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003). La FN viene secreta come dimero, contenente ponti disolfuro, costituito principalmente da tre tipi di moduli: I, II e III (Hynes, 1990; Pankov and Yamada, 2002). Questi moduli costituiscono domini che andranno a legare una varietà di molecole situate sia nella matrice extracellulare sia sulla superficie della cellula, incluse il collagene, i glicosamminoglicani, la fibrina, le integrine e la stessa fibronectina. E' stato ipotizzato essere necessaria l'attivazione della FN perché possa assemblarsi e quindi formare le fibrille (Johnson et al., 1999; Mosher, 1993; Schwarzbauer and Sechler, 1999; Sechler et al., 1996). L'attivazione è un processo indotto dall'interazione della FN con recettori di superficie, generalmente rappresentati dal recettore integrina $\alpha 5\beta 1$ (Fig. 4).

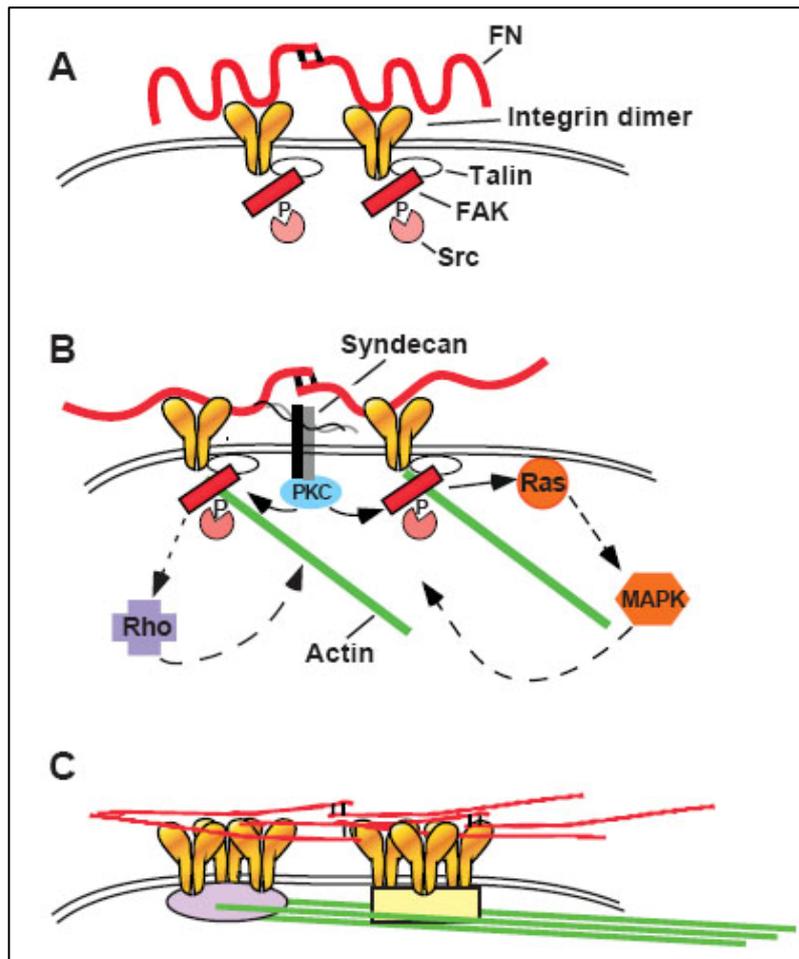


Fig. 4: Modello di assemblaggio FN-ECM. (A) FN inattiva interagisce con le integrine, inducendo un raggruppamento ed una co-localizzazione della Talin (ovale bianco) e delle chinasi di adesione focale (FAK) (rettangolo rosso). L'autofosforilazione di FAK causa il reclutamento di Src (cerchio rosa). (B) Le integrine raggruppate con il Sindecan co-localizzato (barre grigia e nera) organizza il citoscheletro dell'actina (linee verdi) e attiva i trasduttori del segnale, come il Ras/MAP chinasi (arancio), Rho GTPasi (viola) e la proteina chinasi C (PKC) (blu). I segnali finali di questa via della trasduzione del segnale determina il rafforzamento dell'organizzazione del complesso actina-FAK. (C) La concentrazione dei dimeri di FN legati alle integrine raggruppate promuove le interazioni FN-FN e la formazione delle fibrille (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003).

Un'elevata produzione di fibronectine caratterizza i processi cicatriziali. La particolare composizione aminoacidica permette loro di legare sia proteine delle membrane plasmatiche delle cellule connettivali (per esempio, le integrine) sia componenti della matrice extracellulare, come fibre collagene, eparina, eparansolfato. La Fibronectina è una molecola proteica formata da omodimeri di catene dal peso molecolare di 250 KDa codificate da un unico gene anche se sono note diverse isoforme generate da splicing alternativi. Il ruolo di questa proteina è quello di mediare l'adesione delle cellule alla matrice, e di legare attraverso differenti domini integrine, proteoglicani, collagene e fibrina (Martinez e Araujo, 2004).

Le *Tenascine* (TN), al contrario di tutte le altre proteine dell'ECM, comprendono una famiglia di glicoproteine (TN-C, TN-R, TN-X e TN-W) espressa tanto nei tessuti embrionali, particolarmente durante lo sviluppo neurale, l'osteogenesi e l'angiogenesi, quanto nell'adulto, durante i normali processi di accrescimento e rigenerazione nervosa. Questa proteina viene, però, maggiormente studiata negli stati patologici quali disordini vascolari, tumorigenesi e processi metastatici, nei quali la sua espressione è risultata fortemente incrementata.

Il genoma umano ospita quattro geni codificanti la proteina TN ottenendo, di conseguenza, quattro tipi di tenascine, così denominate: tenascina-C (citotactina, antigene miotendineo, GMEM, hexabrachion, J1), tenascina-R (restrictina, janusina), tenascina-X (gene X), tenascina-W (o tenascin-N) (Fig. 5).

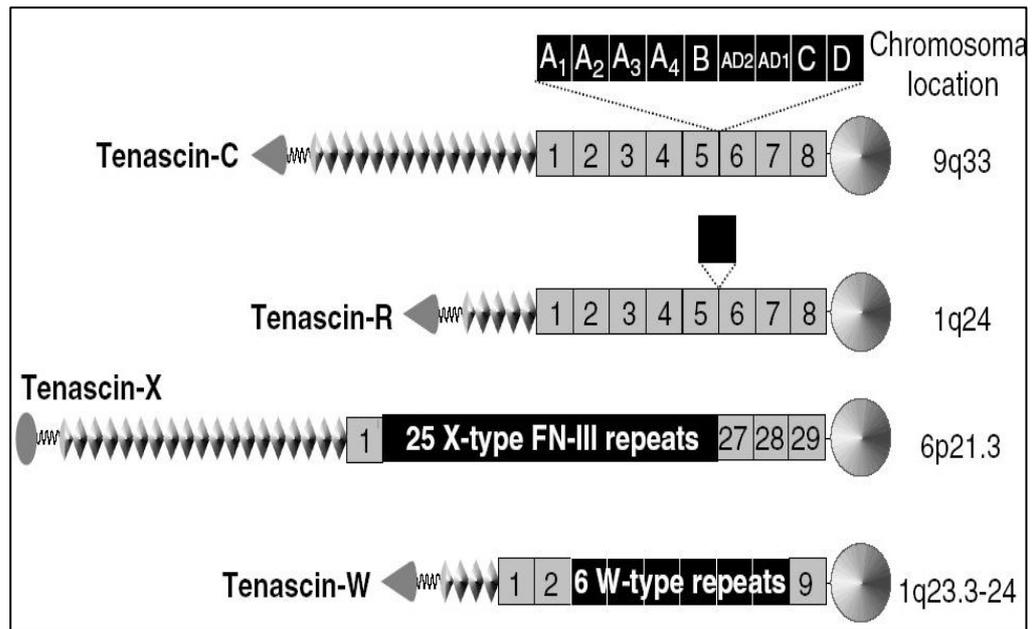


Fig. 5: Modello strutturale di una subunità delle quattro tenascine umane. Viene indicata la localizzazione dei geni codificanti la rispettiva proteina.

Queste proteine sono in grado di suscitare l'interesse dei ricercatori grazie ad una sua duplice ma contrapposta proprietà di adesione e anti-adesione che coesistono nella molecola nativa. Queste attività opposte sono la conseguenza del legame tra le TN e gli altri componenti della ECM e i recettori della superficie cellulare. Le tenascine, infatti, legano con un'elevata affinità diverse proteine e carboidrati. I recettori di superficie specifici per le TN comprendono membri della famiglia eterodimerica delle integrine (Jones and Jones, 2000).

Il primo membro di questa famiglia è la Tenascina C (TN-C), nota anche con numerosi sinonimi sopraccitati. E' una glicoproteina nella quale sei subunità, con una massa molecolare compresa tra i 180 ed i 250 kDa, sono legate tra loro, probabilmente, a livello delle porzioni N-terminali mediante ponti disolfuro (Pas et al., 2006). Dal centro dell'esamero TN-C hanno

origine sei braccia, le cui porzioni prossimali sono fini e rigide, mentre le porzioni distali sono spesse e molto flessibili. Inoltre le parti terminali delle braccia contengono un dominio globulare con un'elevata densità elettronica (Jones and Jones, 2000) (Fig.6 (a) e (b)).

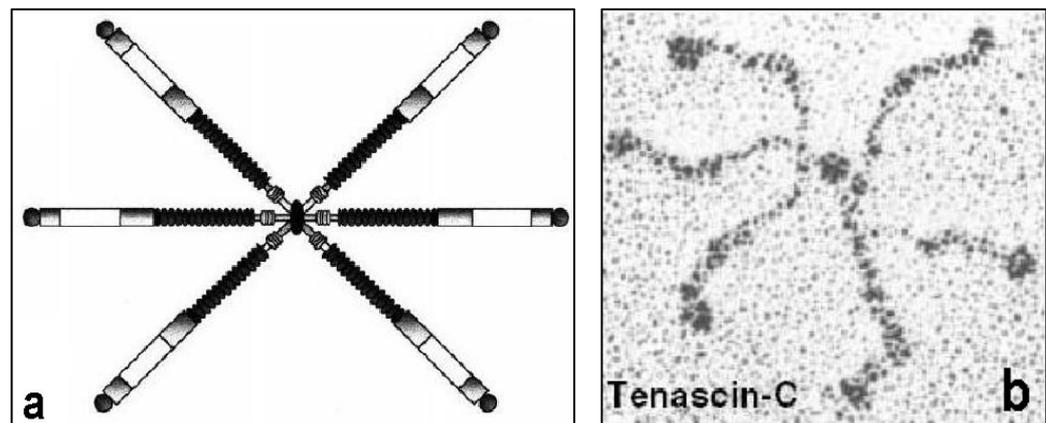


Fig.6: Struttura della tenascina C: (a) modello hexabrachion; (b) immagine al microscopio elettronico della molecola (Jones and Jones, 2000).

Ogni subunità è composta da quattro parti principali: un dominio globulare N-terminale, una sequenza di ripetizioni simili al fattore di crescita epidermica (EGF), una sequenza di ripetizioni simili alla fibronectina di tipo III (FN-III) e infine una sequenza carbossi-terminale, che mostra un'omologia al dominio globulare delle catene β e γ del fibrinogeno (Gulcher et al., 1991). Otto ripetizioni della sequenza FN-III sono costitutivi e non subiscono mai splicing, mentre nove sono ripetizioni inserzionali che possono subire splicing in diverse combinazioni (Nicolò et al., 2002) (Fig.7).

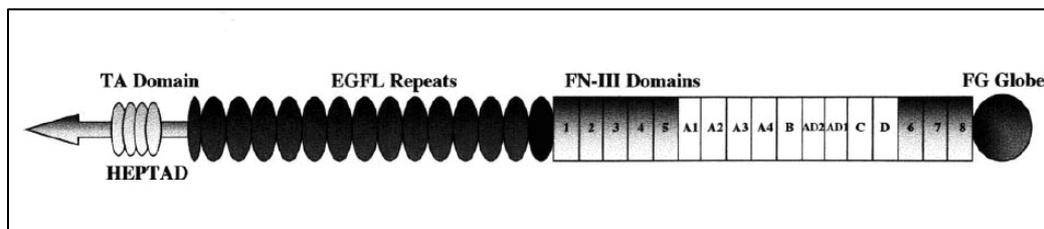


Fig.7: Rappresentazione schematica di un singolo polipeptide della proteina tenascina-C.

La presenza di questa proteina è stata osservata sia in condizioni fisiologiche che in quelle patologiche. Ciò dipende dalle circostanze ambientali e dal tipo cellulare nel quale viene espressa. Il suo ruolo fisiologico comprende le interazioni mesenchimali-epiteliali che si sviluppano durante il rimodellamento tissutale ed il differenziamento cellulare di organi quali l'intestino, il rene e la ghiandola mammaria. L'espressione della TN-C varia moltissimo nei differenti tessuti, essendo collegata agli stadi di sviluppo dell'organismo. E' stato osservato, però, che questa espressione cambia drasticamente sotto diverse condizioni patologiche, come tumori, degenerazioni tendinee, sinoviti, coliti, adenoma del colon, carcinoma colon-rettile e patologie del midollo osseo (Erickson and Bourdon, 1989; Kaartenaho-Wiik et al., 1996; McCachren and Lightner, 1992; Riedl et al., 1992; Soini et al., 1993). La TN-C viene anche prodotta nei fibroblasti, i quali aumentano la sua espressione a causa di stress meccanici (Chiquet-Ehrismann, 1995; Jones and Jones, 2000; Zago et al., 2008). Nei fibroblasti di gengiva umana non si ha l'espressione della proteina tenascina, che si ha invece in quelli della polpa (Martinez and Araújo, 2004). Questo può pertanto suggerire che tale sintesi in questi fibroblasti può essere

relazionata a stress meccanici e fattori ambientali, i quali possono alterare i componenti cellulari ed extracellulari.

La proteina TN-C è stata osservata per la prima volta durante la gastrulazione e la formazione del somite, a livello delle cellule della cresta neurale, poi nelle fibre gliali durante il differenziamento neuronale; inoltre, nel sistema nervoso periferico, viene espressa dalle cellule di Schwann durante la mielinizzazione. Oltre che nel sistema nervoso, la TN-C è espressa durante la morfogenesi del tessuto osseo, del tessuto connettivo e del tessuto cardiaco e vasale. Nell'adulto, l'espressione della TN-C è stata osservata a livello dei siti di neovascolarizzazione e nelle ferite che stanno andando incontro alla cicatrizzazione (Mackie et al., 1988). Inoltre risulta essere sovraregolata in patologie quali l'ipertensione vascolare e nel tessuto stromale che circonda i tumori che si stanno sviluppando e le metastasi (Chiquet-Ehrismann et al., 1986; Mackie et al., 1987; Jones et al., 1997). Studi precedenti hanno dimostrato che durante il rimodellamento della ECM, nei processi di guarigione di ferite o di fenomeni maligni, cominciano ad essere espressi nuovi componenti della membrana basale, tra cui, appunto, la TN.

La distribuzione della tenascina nella pelle sana e nelle ferite in via di guarigione è stata studiata nel ratto mediante analisi immunostochimica. Nella pelle sana la proteina si trova distribuita in modo irregolare, in particolare a livello delle membrane basali, mentre nelle ferite si nota un forte incremento dell'espressione soprattutto a livello del margine esterno (Mackie et al., 1988). Questi risultati dimostrano che la migrazione e la proliferazione delle cellule epidermiche inducono un aumento della produzione di tale proteina.

La proprietà della TN-C maggiormente studiata è quella di anti-adesione poiché interferisce con le funzioni della fibronectina, quali appunto l'adesione, la migrazione, la crescita ed il differenziamento cellulare (Chiquet-Ehrismann et al., 1988; Chiquet-Ehrismann, 2004). L'adesione cellulare è un processo fondamentale per la formazione e il mantenimento dei tessuti e quindi per una loro corretta funzione. Recentemente è stato descritto il meccanismo d'azione attraverso il quale la tenascina, interagendo con la fibronectina, modula negativamente l'adesione cellulare. In condizioni fisiologiche i fibroblasti si legano alla fibronectina attraverso il recettore specifico, l'integrina $\alpha 5\beta 1$, in grado di riconoscere una specifica sequenza (RGD) nel 10° dominio FN-III e attraverso syndecan-4, un proteoglicano transmembranario, che si lega alla catena eparan solfato situata nel 13° dominio FN-III (Fig.8 (A)).

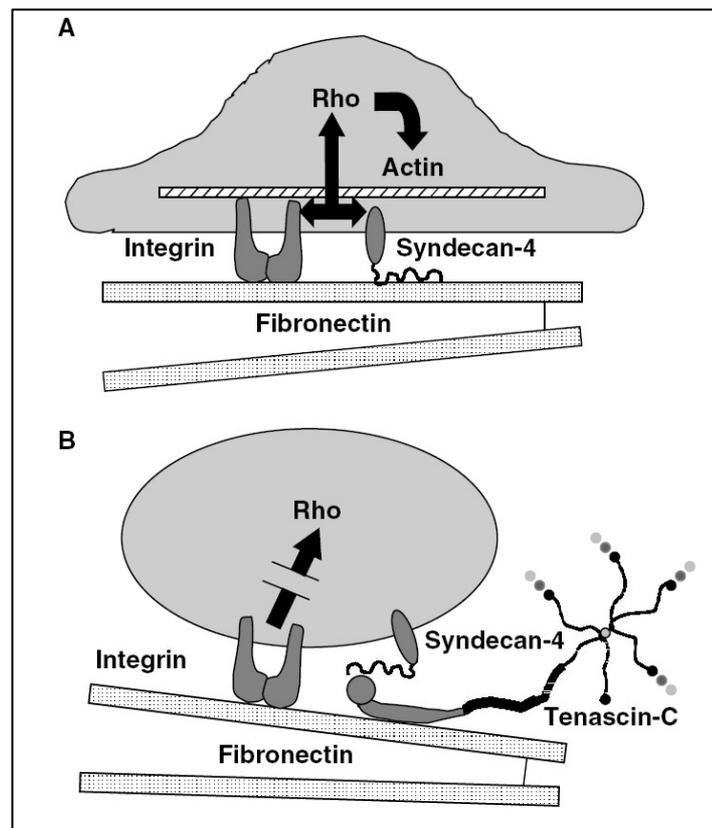


Fig.8: Meccanismo d'inibizione della tenascina sull'adesione cellulare mediata dalla fibronectina.

Il legame sinergico che si origina attiva un mediatore del segnale, denominato Rho, provocando, di conseguenza, l'assemblaggio delle fibre di actina e conducendo all'adesione cellulare. La tenascina-C è in grado di interferire con l'interazione fibronectina/syndekan-4, attraverso il legame ad entrambi i partners. Infatti è in grado di legarsi con il proprio dominio carbossi-terminale FN-III al 13° dominio FN-III della fibronectina, mentre mediante il suo dominio carbossi-terminale, simile al fibrinogeno, si lega all'eparan solfato del syndekan-4 (Fig.8 (B)). Ciò determina un forte indebolimento del segnale sinergico derivante dal legame tra l'integrina $\alpha 5\beta 1$ ed il syndekan-4; a sua volta la molecola Rho viene inattivata così da avere una riduzione nell'adesione cellulare (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). L'inibizione risulta incrementata nella crescita di cellule tumorali mentre essa è fortemente ridotta nella proliferazione di cellule sane (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004).

Gli altri quattro tipi di TN sono dati da un rimaneggiamento della molecola base della TN-C.

La TN-X è stata localizzata a livello di un grande gene posto sul cromosoma 6. Rappresenta il membro più grande della famiglia delle tenaschine e la sua struttura completa è stata osservata solo per la specie umana (Bristow et al. 1993), bovina (Elefteriou et al. 1997) e murina (Ikuta et al. 1998). Grazie alla microscopia elettronica, Elefteriou e collaboratori (1997) hanno potuto associare alla TN-X una struttura monomerica con caratteristiche flessibili. Rispetto agli altri membri della famiglia, questa proteina ha un'espressione prevalentemente localizzata nel tessuto cardiaco e nel muscolo scheletrico (Ikuta et al., 2000). Mutazioni a livello del gene codificante per la TN-X possono causare l'insorgenza di svariate patologie, quali le immunodeficienze e l'artrite reumatoide giovanile. Possiede

anche un ruolo di rilevante importanza nello sviluppo, in quanto una delezione su questo gene è responsabile della sindrome di Ehlers-Danlos, una malattia del tessuto connettivo caratterizzata da ipersensibilità della pelle e delle articolazioni, fragilità vascolare e difficoltà nella guarigione delle ferite (Burch et al., 1997; Lindor and Bristow, 2005).

La TN-R è, invece, l'elemento più piccolo di questa famiglia. E' nota come restrictin, janusin e J1_{160/180} (Fuss et al., 1991; Norenberg et al., 1992). La sua struttura trimerica e composta da molti domini associata alle sue proprietà elastiche suggerisce che questa proteina intervenga nelle interazioni tra le molecole di superficie e differenti cellule e che sia coinvolta nella formazione del network all'interno della matrice extracellulare (Oberhauser et al., 1998; Zacharias et al., 1999; Lundell et al., 2004). La TN-R viene sintetizzata dagli oligodendrociti durante la mielinizzazione verso la fine della gestazione e nel primo sviluppo postatale (Jones and Jones, 2000). La sua espressione è apparentemente ristretta al sistema nervoso centrale e potrebbe giocare un ruolo importante nello sviluppo della crescita assonale e nella mielinizzazione, la quale potrebbe essere mediata dalle sue proprietà contrapposte, rappresentate dall'adesione a livello degli astrociti e la repulsione nei neuriti (Fuss et al. 1993).

Infine, poco è noto riguardo la TN-W. In letteratura viene descritta solo nello zebra danio (Weber et al., 1998) e nel topo (Scherberich et al., 2004). Durante lo sviluppo dello zebra danio i trascritti della TN-W sono stati trovati nel somite e nelle cellule della cresta neurale, a livello della quale viene co-espressa con la TN-C (Weber et al., 1998). Nel topo, invece, gli anticorpi utilizzati contro la TN-W hanno mostrato una considerevole sovrapposizione tra l'espressione della TN-C e quella della W nella ECM dell'osso in fase di sviluppo, nel muscolo liscio intestinale e nel rene metanefrico (Scherberich et al., 2004).

Scherberich e collaboratori (2004) hanno inoltre osservato l'espressione di questa proteina nel limbo, la sorgente delle cellule staminali corneali.

Quest'ultimi membri della famiglia delle TN sono co-espressi, in variabili quantità, alla TN-C. Ciò suggerisce che queste combinazioni servano a rafforzare gli effetti biologici. Ad esempio, la TN-C e la TN-X sono co-espresse nel tessuto connettivo, nei tendini, nel derma, nel cuore, nel rene, nella muscolatura vasale e durante lo sviluppo neurale negli astrociti e nelle cellule di Schwann (Ikuta et al, 2000).

2. SCOPO DELLA RICERCA

La citotossicità dei biomateriali dentari è stata ampiamente dimostrata in passato, ma le risposte cellulari legate allo stress citotossico o genotossico indotte dai monomeri che compongono questi biomateriali, sono complesse e ancora lontane dall'essere del tutto conosciute. Le degradazioni idrolitiche condotte sia dai tessuti stessi che dagli enzimi presenti nella saliva (es. le esterasi) possono durare per un lungo periodo di tempo (Freund and Munksgaard, 1990) successivo alla polimerizzazione, causando il rilascio dei singoli componenti, quali i monomeri, in quantità comprese nel range tra microgrammi e milligrammi (Spagnuolo et al., 2006) e queste stesse quantità liberate sono ritenute responsabili di diversi effetti citotossici e metabolici (Unemori et al., 2001), effetti immunologici locali (Jontell et al., 1995) e reazioni infiammatorie di tipo cronico della polpa di dente umana (Costa et al., 2000, 2003a,b). Alcuni studi hanno evidenziato che questo rilascio di monomeri ha un valore elevato, subito dopo la polimerizzazione dei compositi, e diminuisce con il passare del tempo (Çetingüç et al., 2007). Tuttavia effetti tossici sul metabolismo cellulare sono stati riscontrati anche dopo 160h dalla polimerizzazione (Bouillaguet et al., 1996).

L'analisi degli effetti indotti dal monomero resinoso HEMA, una volta entrato in contatto con le cellule da noi utilizzate, ha rappresentato la base del nostro studio. Quest'ultimo è stato condotto trattando fibroblasti di gengiva umana e di polpa dentale umana con diverse concentrazioni del materiale e per tempi diversi, allo scopo finale di mimare il più possibile il rilascio dalle matrici polimerizzate e di ottenere un protocollo di studio che permetta la valutazione della biocompatibilità di un

materiale prendendo in considerazione diverse attività cellulari. A tal fine l'analisi degli effetti dannosi, è stata eseguita applicando tecniche di microscopia elettronica a scansione, che hanno permesso di studiare la morfologia cellulare ed i suoi eventuali mutamenti, tecniche di biologia molecolare e di immunocitochimica, per lo studio del comportamento di alcune proteine della ECM, quali il collagene di tipo I e la tenascina C.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture di fibroblasti umani di gengiva e polpa

Fibroblasti di gengiva e polpa umani (HGFs e HPFs) sono stati isolati partendo rispettivamente da biopsie di tessuto gengivale e da terzi molari, ottenuti da volontari sani dopo il loro consenso informato secondo le linee guida della National Bioethics Committee. Le biopsie di gengiva umana, dopo il prelievo chirurgico, sono state immediatamente immerse nel terreno specifico, rappresentato dal Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12, per un periodo massimo di 1 ora. Successivamente, lavorando sotto cappa sterile, le biopsie sono state risciacquate con phosphate buffer saline solution (PBS), tagliate in pezzi di tessuto molto piccoli, poste in idonei contenitori, quali le Petri, e incubate con lo stesso terreno sopracitato contenente il 10% di siero bovino fetale (FBS), 1% di penicillina e streptomina ed un 1% di Fungizone. Le biopsie vengono, poi, mantenute ad una temperatura costante di 37°C ed a un'atmosfera umidificata di CO₂ al 5% (v/v). Lo stesso trattamento viene eseguito per le colture di polpa umana. Inizialmente viene rotto il molare con un mortaio specifico, così da poter prelevare la polpa dentale dalla cavità pulpare. Successivamente questo tessuto viene tagliato in pezzi piccoli e messo ad incubare con il terreno DMEM)/F12.

Le colture sia di HGFs che di HPFs sono state utilizzate tra il quarto e l'ottavo passaggio per questo studio.

3.2 Trattamento con il monomero resinoso HEMA

Per ogni esperimento, l'HEMA è stato disciolto in etanolo, ottenendo così una soluzione stock e poi diluito in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sia con il 2% sia senza siero, contenente l'HEMA a concentrazioni differenti: 0.1mmol/L, 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L. Per tutti gli esperimenti eseguiti, la concentrazione finale dell'etanolo è stata dello 0.2%, inferiore alla concentrazione massima non tossica dello 0.3%.

3.3 Saggio di vitalità cellulare

Allo scopo di determinare le concentrazioni non tossiche del monomero resinoso HEMA per le nostre linee cellulari, HGFs e HPFs, abbiamo eseguito un saggio di vitalità cellulare usando il 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

Inizialmente le HGFs sono state seminate, con una confluenza di 1×10^5 per ogni pozzetto di una piastra da 6, e incubate per 24h con terreno DMEM contenente il 10% di FBS, 1% di penicillina e streptomina e 1% di fungizone. Dopo il periodo di crescita cellulare, il terreno è stato cambiato con del medesimo fresco, ma contenente differenti concentrazioni del monomero: 1mmol/L, 3mmol/L, 5mmol/L, 7mmol/L e 10mmol/L, incubando poi le cellule per altre 24h. Al termine del periodo di trattamento, i campioni sono stati lavati con PBS ed il terreno è stato sostituito con dell'altro contenente 0.5mg/ml di MTT, lasciandoli in incubazione per almeno 2h. Le HGFs ed il colorante Formazan sono stati solubilizzati in uno specifico solvente (0.1N HCl in Isopropanolo) e la densità ottica della soluzione così ottenuta è stata letta alla lunghezza d'onda di

570nm, mediante l'utilizzo dello spettrofotometro ND-1000 NanoDrop (NanoDrop Technologies, Rockland, USA).

Sui dati ottenuti da questo saggio, è stato eseguito un secondo MTT testando concentrazioni e tempi diversi a seconda della linea cellulare utilizzata. Per quanto riguarda le HGFs, la concentrazione di HEMA testata è stata di 3mmol/L per differenti tempi di esposizione: 0h, 24h, 72h e 96h. Le HPFs sono state, invece, trattate con tre diverse concentrazioni: 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L per tempi di 72h, 96h e 1 settimana. Entrambi gli esperimenti sono stati condotti in triplo.

3.4 Analisi morfologica cellulare delle HGFs con il FEISEM

Per eseguire una buona analisi con il microscopio elettronico a scansione, le HGFs sono state seminate su appositi supporti, quali wafers di silicio, posti in ogni pozzetto di una multiwell da 6. Sono stati utilizzati due wafers per ogni esperimento e l'intero esperimento è stato condotto in triplo. Al termine delle 24h di crescita cellulare, il terreno è stato sostituito con DMEM fresco senza siero contenente 3mmol/L HEMA, trattando le cellule per 0h, 24h, 72h e 96h. Alla fine di ogni periodo di esposizione, le HGFs su silicio sono state fissate immergendole in una soluzione di glutaraldeide al 2% in PBS, per 1h a temperatura ambiente (RT). Successivamente i campioni sono stati lavati con lo stesso tampone usato per il fissativo e poi post-fissati con 1% di OsO₄ in PBS per 30 minuti a RT. I campioni sono stati disidratati immergendoli in etanolo a concentrazioni crescenti (70%, 90%, 100%), seccati mediante la tecnica del Critical Point Dried (CPD 030, Balzers, Lichtenstein) e ricoperti con platino utilizzando il metallizzatore (MED 010 Balzers, Lichtenstein). I campioni così

ottenuti sono stati osservati usando un microscopio a scansione ad alta risoluzione (JSM 890, Jeol LTD, Tokyo, Japan).

3.5 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Solo per i trattamenti effettuati sulle HGFs sono state eseguite estrazioni di RNA totale e successive amplificazioni del gene per il collagene umano $\alpha 1$ di tipo I. Le HGFs sono state coltivate sotto le medesime condizioni descritte nelle tecniche precedenti, quindi 3mmol/L HEMA per 0h, 24h, 72h and 96h. Dopo ogni trattamento, l'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen Germantown, MD, U.S.A.), seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. Allo scopo di rimuovere tracce di DNA genomico è stata eseguita una digestione con DNase I, prevista dallo stesso kit (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Germantown, MD U.S.A.). La quantificazione e la valutazione della qualità dell'RNA totale estratto, sono state condotte mediante l'utilizzo dello spettrofotometro ND-1000 NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, U.S.A.) leggendo i valori di assorbanza a 260 nm e 280 nm. Per stimare la qualità dell'RNA estratto si valuta il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm (DNA) e quella a 280 nm (proteine) con un rapporto ideale intorno a 1.8 - 2. Per ogni campione 1 μ g di RNA totale sono stati retrotrascritti in cDNA (DNA complementare) usando il kit GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) secondo il protocollo consigliato dalla ditta. 1 μ l di cDNA di ciascun campione è stato amplificato con una RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction) utilizzando un set di primer preparati per i geni del collagene umano $\alpha 1$ di tipo I (*COL1A1*) e per il gene housekeeping *hGAPDH* (Gliceraldeide fosfato deidrogenasi umana) utilizzato quale

doppio controllo interno alla reazione. I primer sono stati disegnati utilizzando il Primer Express® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) con la seguente sequenza: *COL1A1* (target size, 468 bp) senso, 5'-ATTCCAGTTCGAGTATGGCGG-3'; antisenso, 5'-GTTGCTTGTCTGTTTCCGGGT-3'; *hGAPDH* (target size, 1041 bp) senso, 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3', antisenso, 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'. È stata poi effettuata una PCR semiquantitativa utilizzando un ciclatore termico Tpersonal 48 (Biometria, Goettingen, Germania) secondo il seguente protocollo: denaturazione iniziale a 95°C per 10'; 25 cicli successivi effettuati a 94°C per 1'; 56°C per 30" (temperatura di annealing); 72°C per 1'; estensione finale a 72°C per 10'. Il volume totale della reazione è stato di 25 µl che comprendevano: 1 µl di CDNA, 0.2 µmol di ciascun primer, 0.2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1X buffer di reazione e H₂O DNAsi free. In ciascun esperimento la possibile contaminazione del DNA è stata determinata introducendo un controllo interno in cui il cDNA è stato omesso dalla mix di reazione e sostituito da H₂O DNase free. Ogni prodotto amplificato (5 µl) è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio; il gel è stato poi osservato utilizzando Image Station 2000R (Kodak, NY, USA) mediante la luce ultravioletta.

3.6 Immunofluorescenza per il pro-collagene α1 di tipo I e la tenascina

Sia le HGFs che le HPFs sono state fatte crescere su vetrini copri-oggetto e incubate, successivamente, con DMEM contenente le diverse concentrazioni di HEMA che abbiamo testato. Il terreno utilizzato era privo di siero ed è stato cambiato giornalmente durante tutti i periodi di esposizione. Le HGFs sono

state trattate con 3mmol/L HEMA per 0h, 24h, 72h e 96h; mentre le HPFs sono cresciute in presenza di 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L HEMA per 0h, 72h, 96h e 1 settimana. Per ogni trattamento sono stati preparati due vetrini e l'intero esperimento è stato condotto in triplo. Al termine del trattamento i diversi vetrini sono stati fissati con formaldeide al 4% e triton 0.1% in PBS per 20 minuti a 4°C. In seguito sono stati lavati con PBS per 10 minuti ciascuno e immersi nella soluzione di blocco rappresentata da latte 1% (latte in polvere naturale privo di grassi Carnation, Carnation Company, Los Angeles, U.S.A.) in PBS, per 30 minuti lasciando i campioni a RT per la detenzione del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e da latte al 2.5% in PBS per 90 minuti, sempre a RT. Dopo il blocco, senza risciacquare, i vari vetrini sono stati incubati con i rispettivi anticorpi primari, selettivi per la proteina di interesse: il monoclonale contro il pro-collagene umano $\alpha 1$ di tipo I (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.) diluito 1:400 nel latte 1% per 1h a 37°C ed il monoclonale contro la tenascina umana (Sigma Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA) diluito 1:100 nel latte al 2.5% per 1h a 37°C. Dopo una serie di lavaggi in PBS i vetrini sono stati incubati con i rispettivi anticorpi secondari: IgG anti-capra coniugato con CY₃ (Sigma, Saint Louis, Missouri, U.S.A.) specifico per l'anticorpo contro il pro-collagene umano $\alpha 1$ di tipo I e IgG anti-topo coniugato sempre con CY₃ per la tenascina, entrambi diluiti 1:2000 per 1h a 37°C. Alla fine, i vetrini sono stati lavati prima con PBS, successivamente con H₂O distillata, e poi montati su vetrini porta oggetto, utilizzando come montante il VECTASHIELD® contenente 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.). L'osservazione è stata fatta con un microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse E800, Tokyo, Japan).

3.7 SDS-PAGE e Western Blotting per pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina

Lo stesso tipo di cellule sono state nuovamente trattate con le stesse concentrazioni e tempi degli esperimenti precedenti per studiare il comportamento delle proteine pro-collagene umano $\alpha 1$ di tipo I e tenascina mediante la tecnica del SDS-PAGE Western Blotting. Al termine dei vari periodi di esposizione con HEMA, i campioni sono stati lisati incubandoli per 30' a 4°C con un buffer di lisi RIPA (50mmol/L Tris-HCl pH 7.4; 1% NP-40; 150mmol/L NaCl; 2mmol/L EDTA; 0.1% SDS; 1mmol/L EGTA; 1mmol/L PMSF; 0.15% β ME) contenente inibitori delle proteasi alla concentrazione di 25 μ mol/L (Sigma Aldrich, St Luis, Missouri, USA). I lisati, poi, sono stati centrifugati per 10' a 14000 rpm (rotazioni per minuto) a 4°C. La quantificazione dei lisati è stata eseguita mediante il metodo colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976) che si basa su di una lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 595 nm. I valori di assorbanza ottenuti hanno permesso di determinare la concentrazione delle proteine totali estratte. Successivamente un quantitativo di 50 μ g di estratto proteico è stato separato su un gel di SDS (sodio dodecil solfato)-acrilammide al 30% in condizioni denaturanti e poi è stato sottoposto ad elettroblotting (Mini Tank Electroblotting System, Owl, Portsmouth, UK) su una membrana di nitrocellulosa overnight a 4°C. Le bande così ottenute sono state evidenziate colorando la membrana con il colorante di Ponceau. Il colorante in eccesso è stato rimosso mediante successivi lavaggi in H₂O distillata, poi la membrana è stata bloccata per 1h a RT immergendola in latte privo di grassi al 2.5% diluito in soluzione di tris buffer / 0.1% Tween 20 (TBS-T) pH 7.5. Rimosso il latte, la membrana è stata incubata per 2h a 37°C, sotto agitazione, con gli anticorpi primari contro il pro-collagene umano $\alpha 1$ di tipo I (Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz,

CA, USA) diluito 1:10000, la tenascina e la β -tubulina umane (Sigma Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA) diluiti rispettivamente 1:250 e 1:10000. La membrana è stata quindi lavata alcune volte in TBS-T pH 7.5 e successivamente incubata in latte, sempre 2.5%, in presenza degli anticorpi secondari. Per la rivelazione dell'anticorpo primario specifico contro il pro-collagene umano $\alpha 1$ di tipo I sono state usate IgG anti-capra coniugate con perossidasi alcalina di rafano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, CA, USA), mentre per la tenascina e la β -tubulina è stato usato un anticorpo secondario IgG anti-topo sempre coniugato con HRP (Sigma Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA), tutti alle diluizioni di 1:80000, con una incubazione di 90' a 37°C. Dopo ulteriori lavaggi in TBS-T pH 7.5, la membrana è stata sviluppata in luminolo ed esposta con il kit ECL per chemiluminescenza (ECL plus, Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Le immagini ottenute sono state acquisite con Image Station 2000R (Kodak, NY, USA).

3.8 Controlli

In ogni analisi sopra descritta è stato eseguito un campione di controllo rappresentato dalle HGFs e dalle HPFs esposte solo all'etanolo, solvente utilizzato per solubilizzare il monomero resinoso HEMA (concentrazione massima finale inferiore allo 0.3% ritenuta non tossica), per saggiare l'influenza dell'etanolo sull'espressione e la sintesi del pro-collagene umano $\alpha 1$ di tipo I e della tenascina.

Per l'immunomarcatura alla fluorescenza, i campioni controllo sono stati fissati con formaldeide 4%/ triton 0.1% e successivamente incubati con solo l'anticorpo secondario

coniugato al CY₃ per evidenziare eventuali interazioni non specifiche tra l'anticorpo ed i gruppi aldeidici liberi del fissativo.

3.9 Analisi Statistica

I risultati sulla vitalità cellulare ottenuti mediante il saggio dell'MTT sono stati ripetuti tre volte e le differenze statiche sono state calcolate mediante il metodo one-way ANOVA ($p < 0.05$) e Dunnett's Multiple Comparison Test ($p < 0.05$). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software GRAPH PAD PRISM 4.0 software (San Diego, CA, USA).

4. RISULTATI

4.1 Saggio di vitalità cellulare

La fig. 9 (a) mostra la vitalità cellulare delle HGFs dopo un trattamento di 24h a diverse concentrazioni di HEMA: 1mmol/L, 3mmol/L, 5mmol/L, 7mmol/L e 10mmol/L, ottenuta eseguendo il saggio del MTT. La tossicità di questo monomero resinoso è funzione della concentrazione e sotto le nostre condizioni sperimentali abbiamo calcolato la TC50 (concentrazione responsabile del 50% della morte cellulare) come 5.83mmol/L.

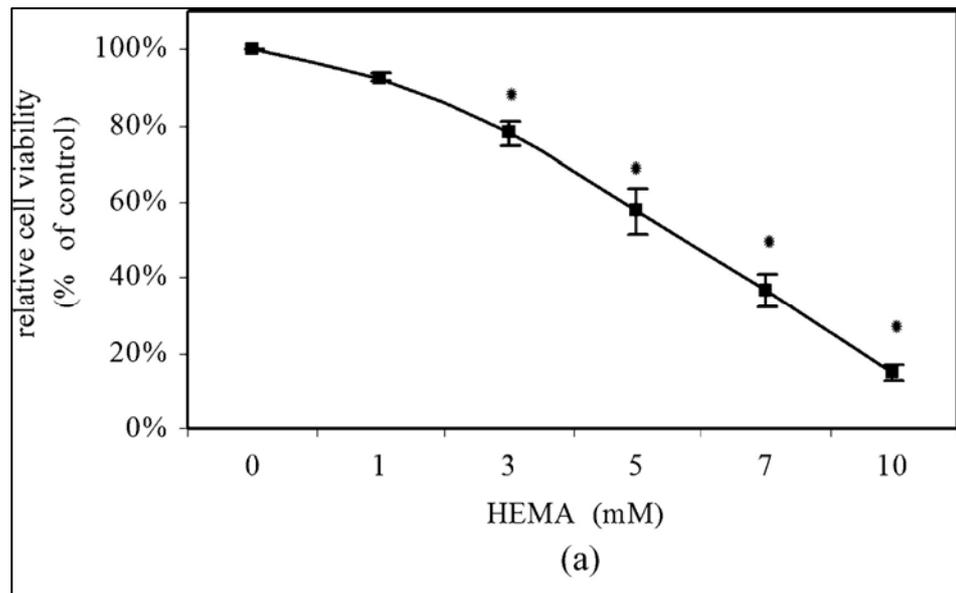


Fig. 9 (a): Effetto citotossica dell'HEMA sulla vitalità cellulare delle HGFs. Le cellule sono state esposte a diverse concentrazioni del monomero resinoso per 24h e, poi, tramite il saggio del MTT è stata valutata la vitalità cellulare. I risultati statisticamente significativi (\pm SD) sono stati espressi in percentuale facendo

riferimento al valore ottenuto dal controllo. *Differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.001$).

Successivamente sono stati condotti saggi di vitalità riducendo le concentrazioni da testare e aumentando i tempi di trattamento. Le HGFs sono state esposte a HEMA 3mmol/L per 0h, 24h, 72h e 96h. La fig. 9 (b) mostra una riduzione della vitalità cellulare in riferimento agli ultimi due tempi di trattamento: 72h e 96h. Precisamente, dopo 96h di esposizione la vitalità cellulare è ridotta a 35%.

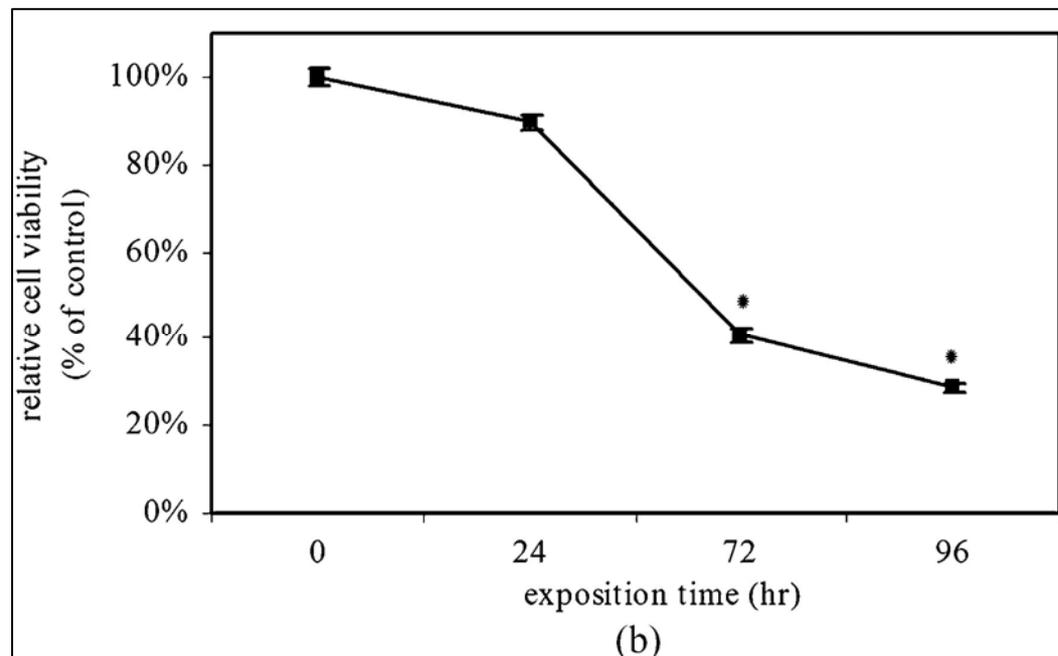


Fig. 9 (b): Effetto citotossico dell'HEMA sulla vitalità cellulare delle HGFs esposte a 3mmol/L per 0h, 24h, 72h e 96h. Dopo 72h di trattamento è stata osservata una diminuzione della vitalità. *Differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.001$).

Le HPFs sono, invece, state trattate con tre diverse concentrazioni di HEMA: 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L per tempi differenti 0h, 72h, 96h e 1 settimana (fig. 10). Al tempo

d'esposizione di 72h, la vitalità cellulare presenta valori superiori al 50% in tutte le concentrazioni testate, mentre è stata osservata una debole riduzione dopo 96h. Nei campioni trattati per 1 settimana vi è stata una forte riduzione della vitalità, in modo particolare nei campioni incubati con 1mmol/L e 3mmol/L.

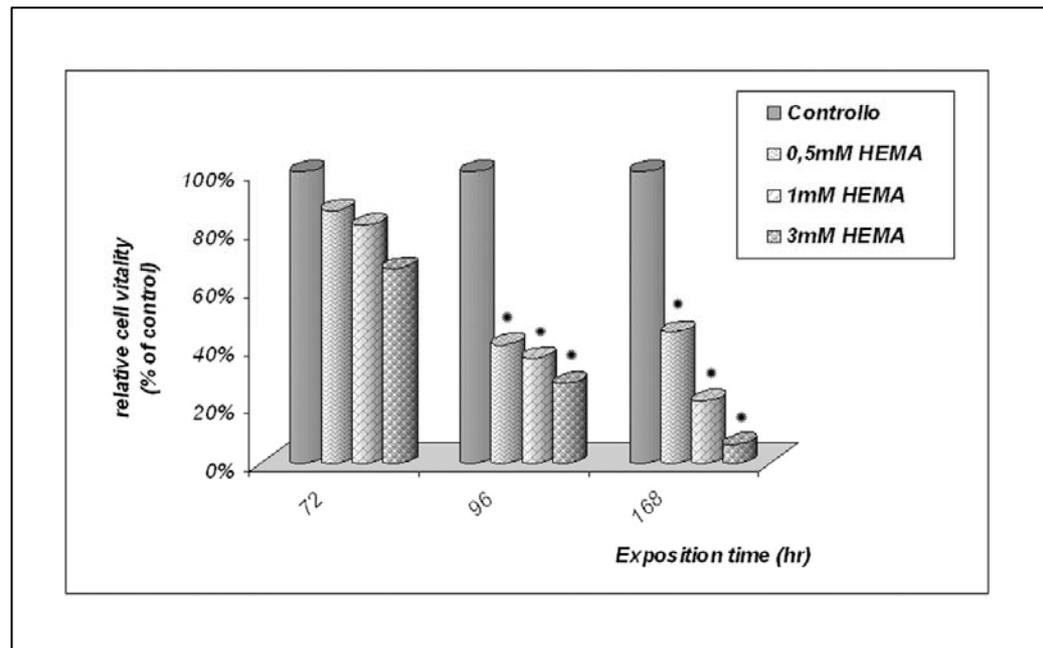


Fig. 10: Vitalità cellulare delle HPFs esposte a 0.5mmol/L-1mmol/L-3mmol/L HEMA per 0h, 72h, 96h e 1 settimana. I valori di questo parametro sono risultati più elevati del 50% in tutti i trattati di 72h, mentre è stata osservata una leggera riduzione dopo 96h di esposizione. Nei campioni trattati per 1 settimana, la vitalità ha subito una forte riduzione, specialmente nei campioni esposti a 1mmol/L e 3mmol/L. I risultati riportati nel grafico sono rappresentativi di esperimenti condotti in triplo ed i valori sono stati espressi in percentuale, facendo riferimento al valore del controllo (cellule non trattate). *Differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.05$).

4.2 Analisi al FEISEM

L'osservazione al microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FEISEM) ha permesso l'osservazione e lo studio della morfologia cellulare delle HGFs trattate sempre con 3mmol/L HEMA per 0h, 24h, 72h e 96h. In fig. 11 (a) sono visibili le HGFs fatte crescere su silicio fino al raggiungimento della confluenza, in assenza del monomero resinoso. Raggiungendo un ingrandimento maggiore, è possibile osservare con migliori dettagli la forma allungata in entrambe le estremità che queste cellule tendono ad assumere. Questa morfologia corrisponde a quella tipica dei fibroblasti (fig. 11 (b)); inoltre sono presenti, sulla superficie cellulare, alcuni corti processi cellulari (fig. 11 (b)). Dopo 24h di trattamento, le HGFs mostrano una morfologia confrontabile a quella delle cellule non trattate (fig. 11(c), 11(d)).

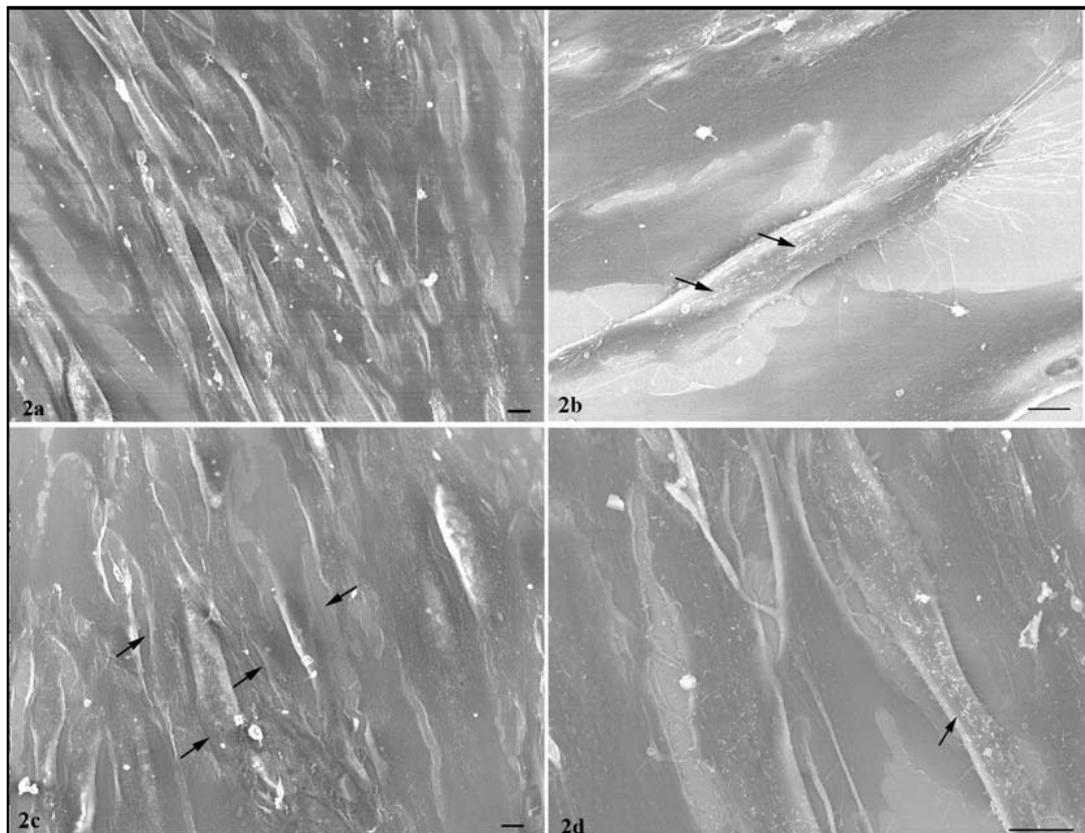


Fig. 11: Immagini FEISEM rappresentanti HGFs trattate con HEMA. (a) HGFs senza trattamento. La superficie del supporto in silicio è totalmente ricoperta da un gran numero di cellule (x1000; bar = 10 μ m). (b) Immagine di fibroblasti con la loro tipica forma allungata e con corti processi cellulari sulla superficie (freccie) (x2000; bar = 10 μ m). (c) HGFs dopo 24h d'esposizione. L'immagine mostra cellule con ancora la tipica morfologia allungata dei fibroblasti confrontabile con quella delle cellule non trattate (x1000; bar = 10 μ m). (d) Ingrandimento maggiore delle medesime HGFs trattate per 24h con HEMA.

Il trattamento con HEMA per 72h, invece, ha determinato un certo aumento degli spazi liberi tra le cellule (fig. 12(a)). Inoltre, la morfologia appare molto più irregolare; le cellule perdono quasi completamente la forma fibroblastica (fig. 12(b)). Dopo 96h d'esposizione al monomero, si è verificata un'ulteriore aumento degli spazi intercellulari (fig. 12(c)) associata ad una quasi completa scomparsa della classica morfologia. Infatti, le HGFs appaiono con forma irregolare e con perdita dei processi cellulari di superficie (fig. 12(d)). Ipotizziamo che l'aumento di questi spazi intercellulari sia dovuto ad una riduzione del numero cellulare, a causa della morte delle cellule durante il trattamento con il monomero.

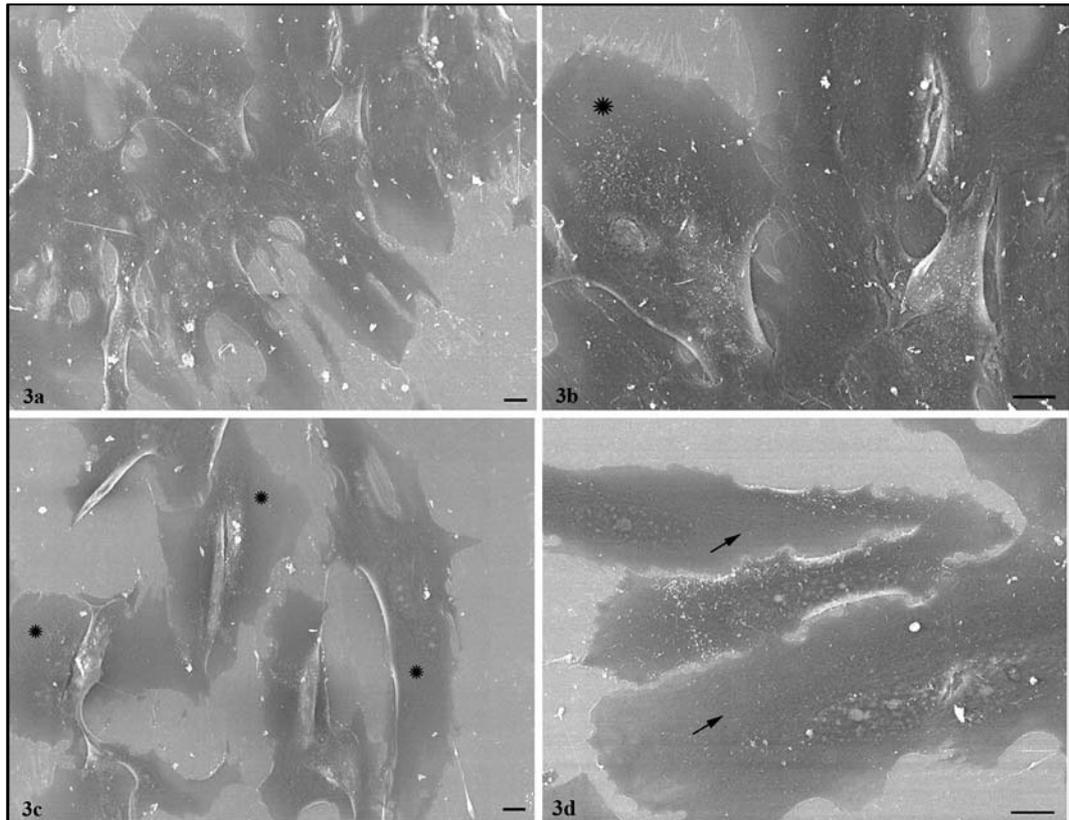


Fig. 12: Immagini FEISEM dopo trattamento con il monomero resinoso. (a) HGFs dopo 72h d'esposizione. E' possibile osservare una debole riduzione del numero di cellule (x1000; bar = 10 μ m). (b) HGFs con morfologia irregolare (*) (x2000; bar = 10 μ m). (c) HGFs dopo 96h di trattamento presentano una perdita totale della morfologia fibroblastica. Inoltre si ha una forte riduzione del numero cellulare (*) ((x1000; bar = 10 μ m). (d) Le cellule mostrano pochi processi cellulari sulla loro superficie (frecce) (x2000; bar = 10 μ m).

4.3 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Con la tecnica della RT-PCR abbiamo studiato gli effetti del monomero resinoso HEMA sulla traduzione del collagene $\alpha 1$ di tipo I nelle HGFs. Nella fig. 13 viene mostrata una debole riduzione del trascritto (mRNA) del collagene nei campioni trattati con 3mmol/L per 24h. Una maggiore riduzione dell'espressione del trascritto è stata osservata nei campioni esposti per 72h e 96h.

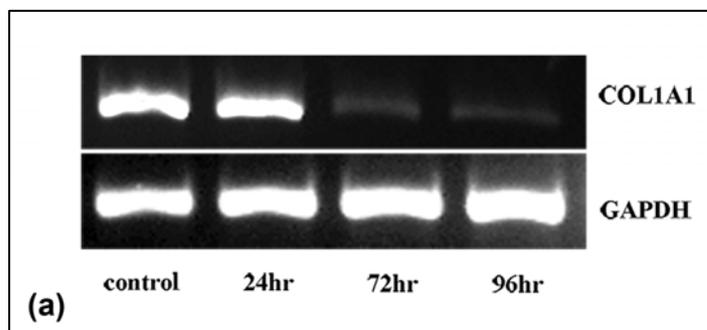


Fig. 13: Amplificazione mediante RT-PCR per la valutazione dell'espressione del trascritto (mRNA) COL1A1. L'espressione si presenta di maggiore intensità nei campioni non trattati (controllo), mentre si riduce debolmente nelle HGFs esposte a 3mmol/L HEMA per 24h. Dopo un'esposizione di 72h e 96h, l'espressione del mRNA risulta drasticamente ridotta. La gliceraldeide-3 fosfato deidrogenasi umana (hGAPDH) è stata usata come controllo di caricamento.

4.4 Immunofluorescenza per il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina

La tecnica d'immunofluorescenza è stata condotta allo scopo di valutare un'eventuale interferenza dell'HEMA con l'espressione proteica di proteine prodotte dai fibroblasti, quali il pro-collagene

$\alpha 1$ di tipo I e la tenascina. Questa ricerca è stata condotta su entrambe le linee cellulari da noi studiate (la tenascina è stata studiata solo nelle HPFs), trattandole però con concentrazioni e tempi diversi.

In fig. 14 (a) sono mostrate le HGFs prive di trattamento (controllo), con il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I organizzato in piccoli cluster attorno al nucleo cellulare. Già dopo 24h d'esposizione, si può osservare una riduzione del segnale fluorescente (fig. 14(b)) ed una scomparsa, quasi definitiva, della marcatura nei campioni trattati per 72h e 96h (fig. 14(c) e (d)).

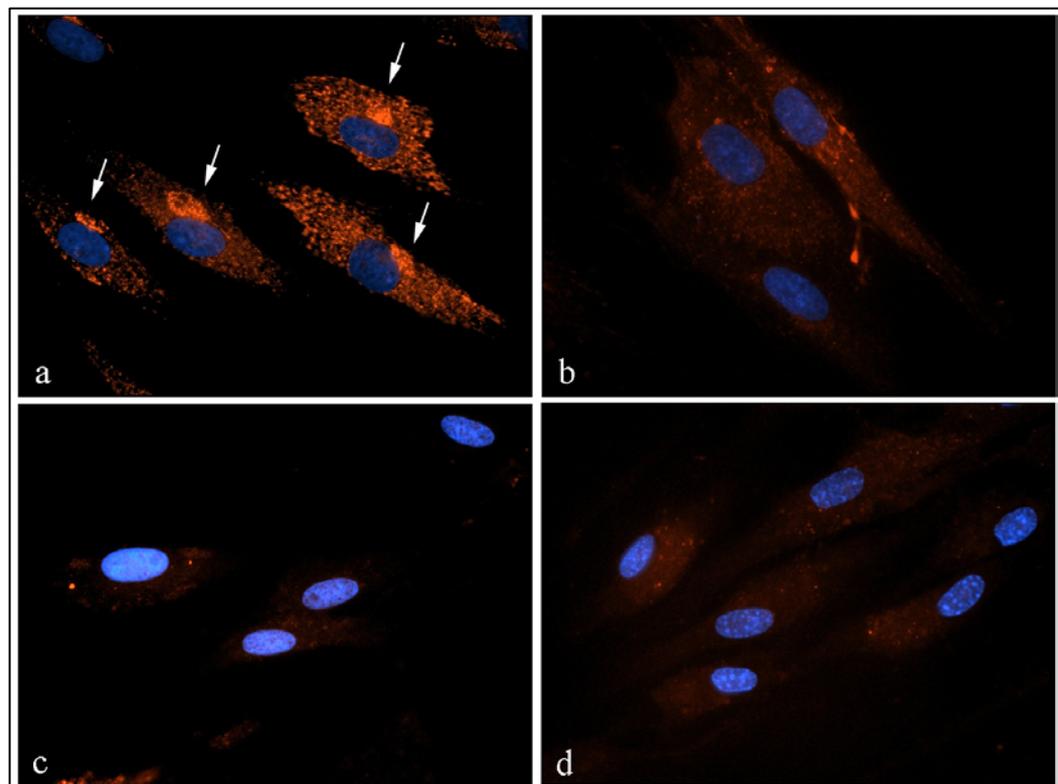


Fig. 14: Localizzazione immunocitochimica del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I nelle HGFs trattate con 3mmol/l per diversi tempi. Lo sviluppo della marcatura è stato condotto mediante l'incubazione delle cellule con anticorpo secondario IgG anti-topo coniugato al CY₃. (a) HGFs senza trattamento. Il segnale del CY₃ è localizzato in piccoli raggruppamenti attorno al nucleo delle cellule (freccie)

(600X). (b) HGFs dopo 24h d'esposizione. Il segnale della fluorescenza è ridotto e sono scomparsi i cluster osservati nelle cellule non trattate (600X). (c, d) HGFs al termine dei trattamenti di 72h (c) e di 96h (d). In entrambe le immagini è possibile osservare una notevole riduzione del segnale della proteina (600X).

Nella fig. 15 è rappresentata l'immunomarcatura effettuata sulle HPFs dopo averle trattate con 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L per 72h, 96h e 1 settimana. In (a), (e), (i) viene rappresentata la marcatura del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I nei campioni non trattati (controllo). Il segnale è disposto in cluster sempre attorno al nucleo della cellula. Con il passare del tempo e l'aumentare della concentrazione, il segnale CY₃ diminuisce fino a scomparire in tutti i trattati per 1 settimana (l, m, n).

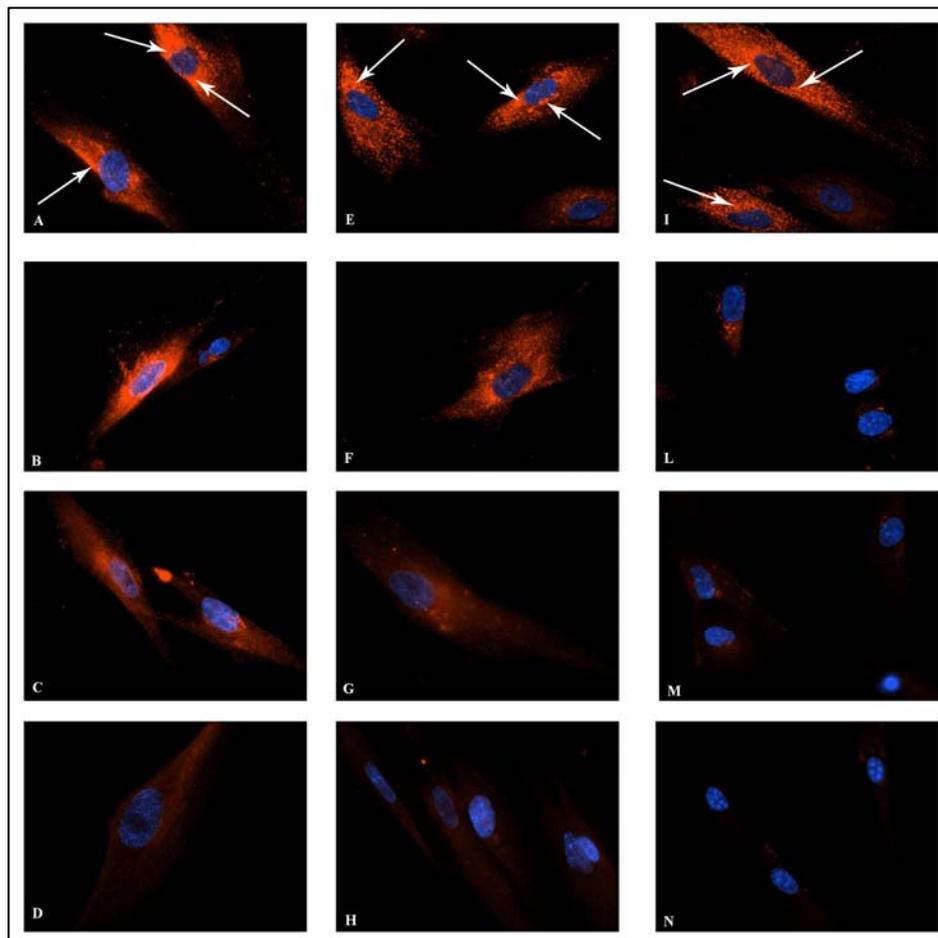


Fig. 15: Localizzazione immunocitochimica del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I nelle HPFs trattate con concentrazioni e per tempi differenti. In fig. (a, e, i) vengono mostrate HPFs non trattate, nelle quali il segnale della fluorescenza è localizzato in un'area attorno al nucleo (freccie) (600X). Nei trattati di 72h e 96h, specialmente con 1mmol/L e 3mmol/L (c, d, g, h), è stata osservata una forte riduzione del segnale CY₃, associata ad una scomparsa dei raggruppamenti attorno al nucleo (600X). (l, m, n) mostrano, infine, il trattamento condotto per 1 settimana. La specifica marcatura ed il segnale sono completamente scomparsi in tutti i trattati (600X).

La fig. 16 presenta la fluorescenza della tenascina dopo l'incubazione con il monomero resinoso. Contrariamente ai risultati del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I, il segnale aumenta d'intensità con l'aumentare delle concentrazioni di HEMA e con il tempo d'esposizione. Infatti nei campioni trattati con 3mmol/L per 72h e 96h (d, h) e con 0.5mmol/L - 1mmol/L - 3mmol/L per 1 settimana (l, m, n) è stato rilevato un forte segnale della fluorescenza.

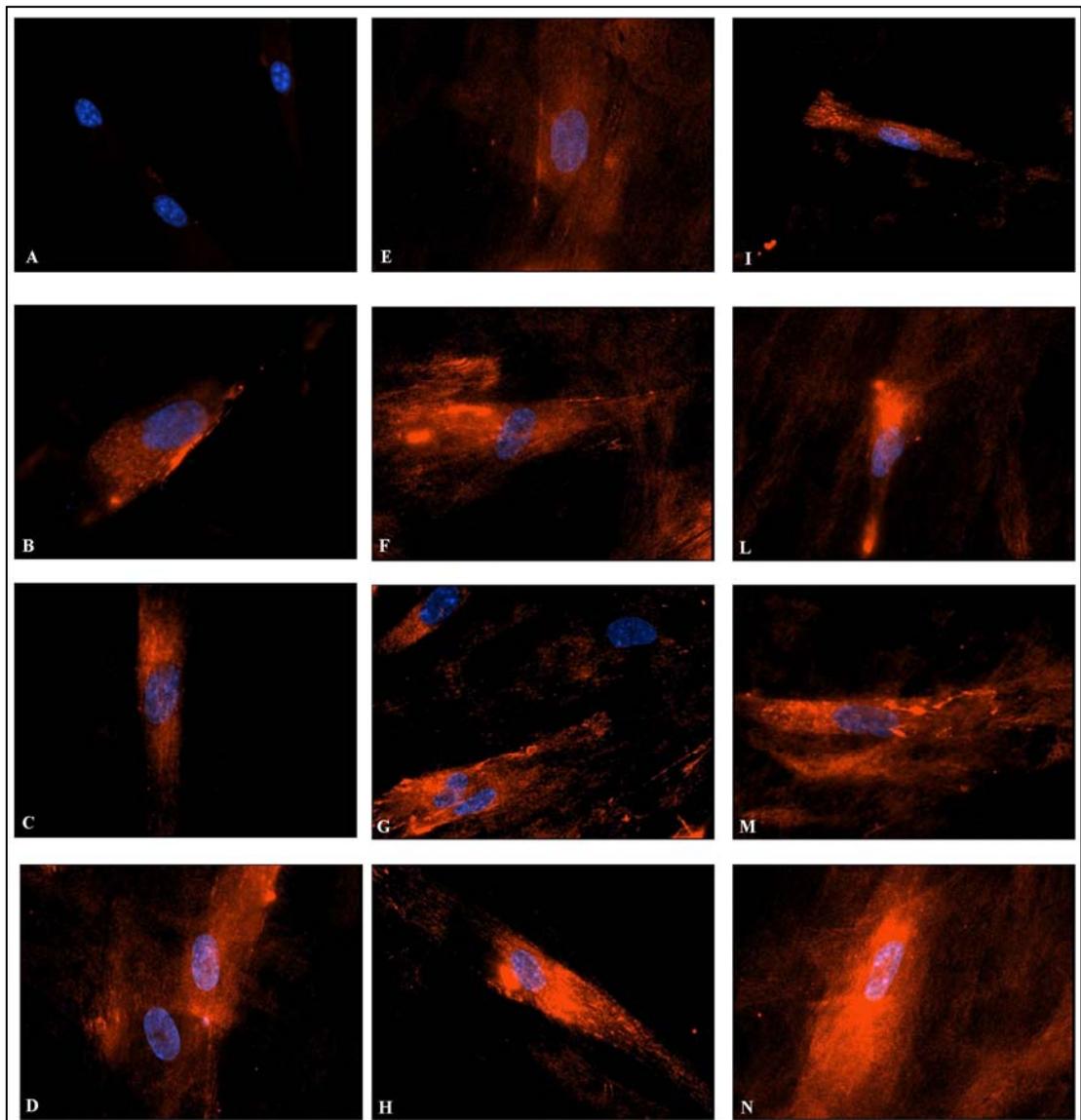


Fig. 16: Localizzazione immunocitochimica della proteina tenascina nelle HPFs trattate con tre differenti concentrazioni di HEMA e per diversi tempi d'esposizione. In fig. (a, e, i) sono

mostrate HPFs senza trattamento, a livello delle quali il segnale del CY₃ è molto blando. La fluorescenza aumenta, poi, con l'aumentare delle concentrazioni del monomero e con il passare del tempo d'esposizione. I campioni trattati con 3mmol/L per 72h e 96h (d. h) e tutti i trattati per 1 settimana (l, m, n) presentano un forte aumento del segnale.

4.5 SDS – PAGE e Western Blotting per il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina

L'analisi con SDS – PAGE e Western Blotting, condotta su HGFs trattate con 3mmol/L HEMA per 0h, 24h, 72h e 96h, ha evidenziato una significativa diminuzione della proteina pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I già nei campioni esposti per 24h. Non è stata, invece, rilevata la presenza della proteina nei trattati a tempi più lunghi: 72h e 96h (Fig. 17).

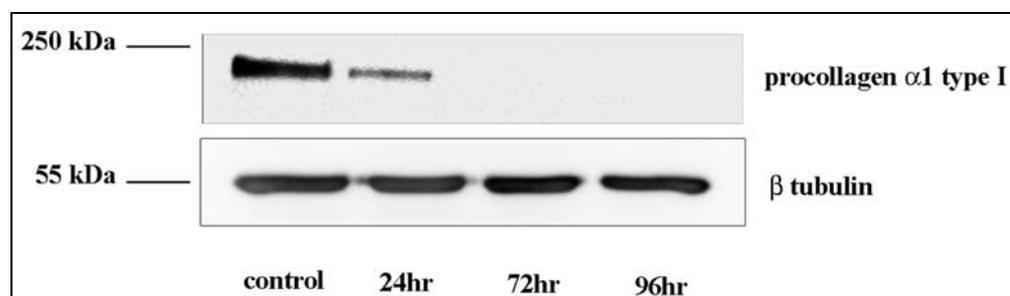


Fig. 17: Analisi in Western Blotting del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I in HGFs esposte a 3mmol/L HEMA per 0h, 24h, 72h e 96h. Nel trattato di 24h è già possibile osservare una forte riduzione dell'espressione della proteina, mentre scompare totalmente il segnale nei tempi più lunghi: 72h e 96h. La β tubulina rappresenta il controllo di caricamento.

Sulle HPFs, invece, lo studio dell'espressione del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e della tenascina è stato condotto dopo averle trattate con differenti concentrazioni: 0.5mmol/l,

1mmol/L e 3mmol/L HEMA per 0h, 72h, 96h e 1 settimana. Per quanto riguarda l'analisi del pro-collagene, dati ottenuti hanno evidenziato una debole diminuzione del segnale proteico nei campioni esposti alla concentrazione di 1mmol/L per 72h, mentre vi è una maggiore riduzione nel trattato 3mmol/L (fig. 18 (a)). Nei campioni esposti per 96h ad 1mmol/L e 3mmol/L vi sono bande molto deboli (fig. 18 (b)). Infine non vi è alcun segnale proteico in tutti i trattati per 1 settimana (fig. 18 (c)).

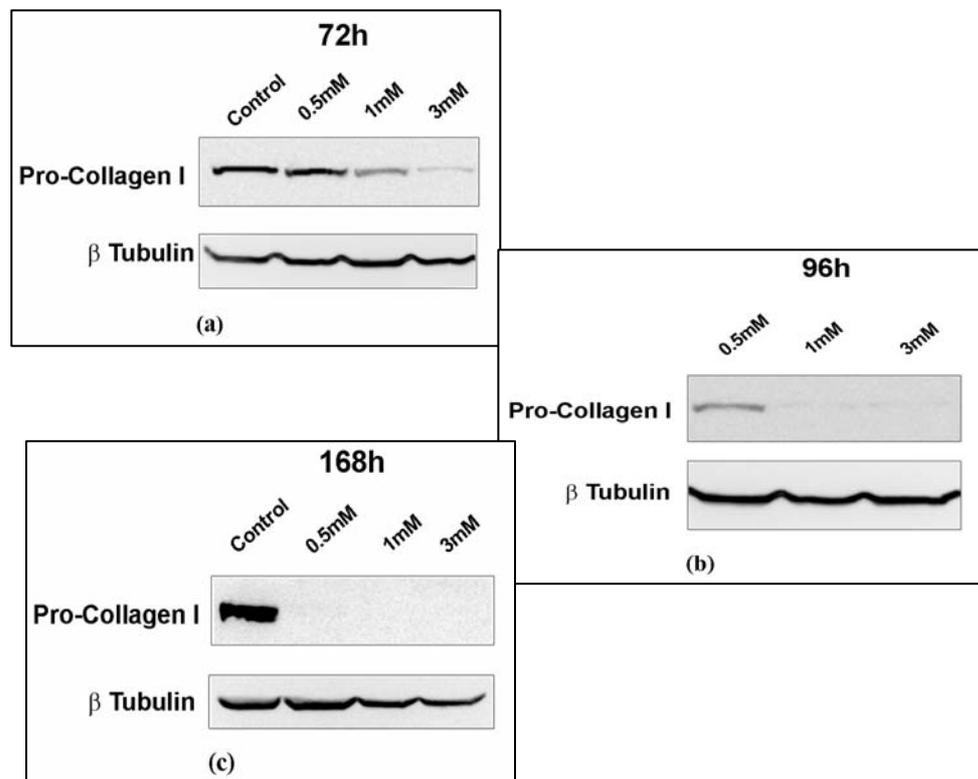


Fig. 18: Analisi in Western Blotting del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I su HPFs esposte a 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L HEMA per tempi differenti: 0h, 72h, 96h e 1 settimana. (a) Nei campioni esposti a 1mmol/L HEMA per 72h vi è un debole segnale, mentre la banda è quasi scomparsa nel trattato a 3mmol/L HEMA. (b) Nei trattati per 96h, invece, il segnale scompare quasi completamente alle concentrazioni di 1mmol/L e 3mmol/L HEMA. (c) Nei trattamenti effettuati per periodi più lunghi, fino

ad 1 settimana, si ha la totale scomparsa della proteina. La β tubulina rappresenta il controllo di caricamento.

Gli effetti dell'HEMA sull'espressione proteica della tenascina sono mostrati in fig. 19. I campioni rappresentanti le cellule non trattate (controllo) mostrano sempre un basso segnale (dato che si combina con i risultati ottenuti alla fluorescenza) (fig. 19 (a) (c)). Dopo 72h di trattamento, a livello di tutti i campioni è stato possibile osservare un leggero aumento nell'espressione della proteina (fig. 19 (a)). Invece dopo 96h d'esposizione, si evidenzia un marcato aumento del segnale proteico nel campione trattato con 3mmol/L HEMA (fig. 19 (b)). Mentre è visibile un drastico aumento dell'espressione della tenascina in tutti i trattati per 1 settimana (fig. 19 (c)).

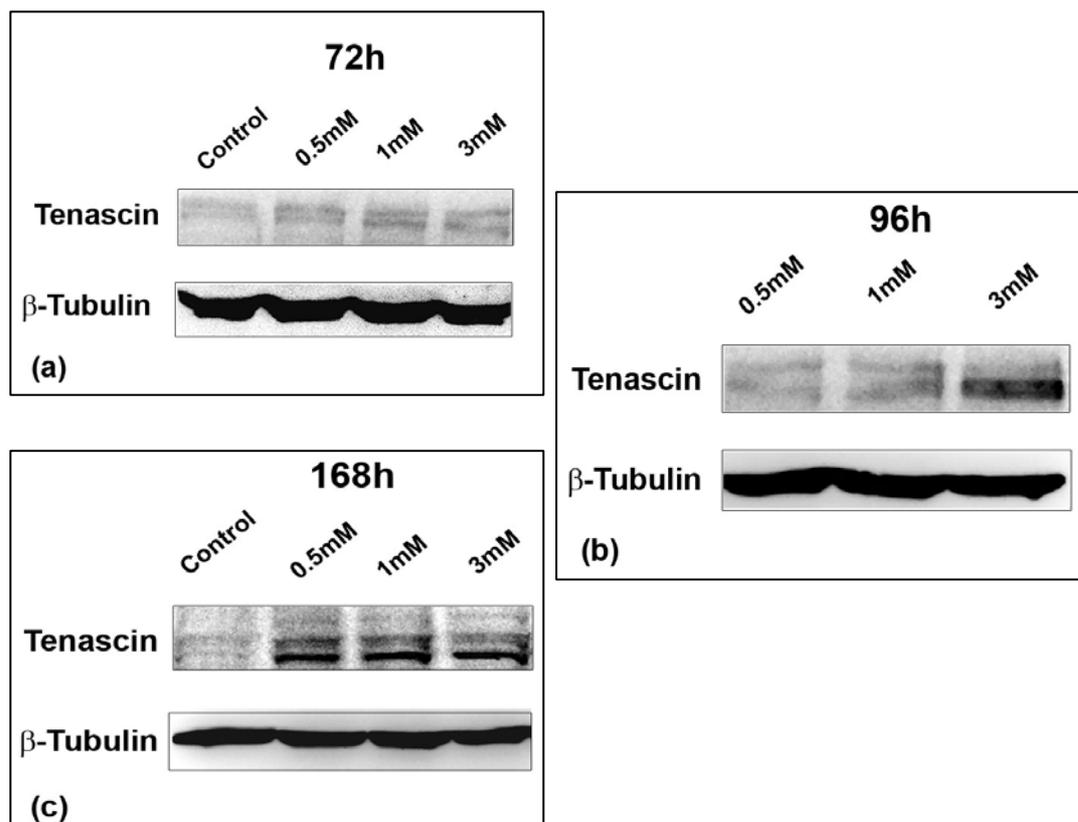


Fig. 19: Analisi in Western Blotting della tenascina su HPFs esposte a 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L HEMA per tempi differenti: 0h, 72h, 96h e 1 settimana. (a) Esposizione alle tre concentrazioni di HEMA per 72h determina un leggero aumento dell'espressione proteica nei trattati rispetto al controllo. (b) Un'esposizione di 96h ha determinato un incremento marcato nel trattato 3mmol/L. (c) Infine, è possibile osservare un netto aumento della proteina nei campioni esposti a tutte le concentrazioni per il tempo più lungo di 1 settimana. La β -tubulina rappresenta il controllo di caricamento.

5. DISCUSSIONE

Il monomero resinoso 2-idrossietil-metacrilato (HEMA), testato in questo studio, è uno dei principali elementi nei materiali utilizzati nell'odontoiatria restaurativa. L'HEMA viene anche ampiamente utilizzato in altri campi della medicina, come l'oftalmologia per la produzione delle lenti a contatto (Goda and Ishihara, 2006; Lord et al., 2006) e nello sviluppo dell'ingegneria tissutale e dei farmaci (Mei et al., 2005).

La percentuale di monomero presente nei materiali e negli adesivi dentali è compresa in un range tra il 30% ed il 55%. L'utilizzo del monomero in una concentrazione così elevata negli agenti dentali ne permette una migliore diffusione a livello dei substrati maggiormente idrofilici, quali la rete di collagene che costituisce la dentina. In questo modo l'HEMA gioca un ruolo fondamentale nella formazione dei cosiddetti strati ibridi, i quali determinano la stabilità a livello dell'interfaccia materiale-dentina (De Munck et al., 2005; Tay et al., 2005).

Nonostante il diffusissimo utilizzo dell'HEMA nei materiali biomedici, la sua totale biocompatibilità e sicurezza biologica sono ancora oggetto di molti studi. Infatti, diversi lavori hanno dimostrato che l'HEMA e altri monomeri vengono rapidamente rilasciati dalle matrici polimerizzate (Çentigüç et al., 2007), raggiungendo la polpa dentale e inducendo effetti avversi (Chang et al., 2005; Nocca et al., 2007). Secondo Ferracane e Condon (1990), la maggior parte dei componenti di questi materiali vengono liberati in quantità elevate entro le 24h dal processo di polimerizzazione. E' stato, inoltre, rilevato un rilascio basso, ma continuo, dei monomeri dentali anche dopo 30 giorni (Moharamzadeh et al., 2007; Polydorou et al., 2007).

Nel presente studio abbiamo cercato di individuare la concentrazione del monomero resinoso HEMA che non causasse alcuna sofferenza cellulare, concentrandoci su tecniche di laboratorio che permettessero di studiare gli eventuali effetti tossici sulla vitalità cellulare e sull'espressione di specifiche proteine.

I diversi test *in vitro* sono stati eseguiti su due diverse linee cellulari, fibroblasti di gengiva e di polpa dentale umane, rappresentanti le due popolazioni di cellule presenti nella cavità orale e che hanno maggiore possibilità di entrare in contatto con i materiali resinosi. Vari studi sulla tossicità dei monomeri rilasciati dalle matrici polimerizzate hanno dimostrato che questi effetti avversi dipendono dal tipo di monomero, dalla concentrazione che è presente nell'ambiente, dal tempo d'esposizione e dal tipo di linea cellulare che entra in contatto con il materiale (Geurtsen et al., 1998). Infatti, molti dati riguardo la citotossicità sono differenti e contraddittori tra loro, a causa delle diverse condizioni sperimentali e soprattutto delle differenti linee cellulari utilizzate negli esperimenti (Çentigüç et al., 2007; Lee et al., 2006; Spagnuolo et al., 2006).

In letteratura è presente una varietà molto ampia di concentrazioni tossiche dei monomeri resinosi. Moharamzadeh e collaboratori (2006) hanno dimostrato che la concentrazione letale di uno specifico materiale può variare non solo con l'utilizzo di differenti tipi cellulari, ma anche tra tipi cellulari ottenuti da diversi donatori. Per questo motivo abbiamo messo in coltura, nel nostro laboratorio, colture primarie di gengiva e di polpa umane, dalle quali abbiamo ottenuto i fibroblasti gengivali e pulpali che sono stati, poi, oggetto dei nostri studi di citotossicità.

Inizialmente sono state testate differenti concentrazioni di HEMA, allo scopo di identificare la concentrazione ritenuta non tossica, specifica per la linea cellulare gengivale e per quella pulpale. Queste concentrazioni erano comprese in un range tra 1mmol/L e 10mmol/L e sono state saggiate mediante il test dell'MTT. Sotto le nostre condizioni sperimentali, la TC50 (concentrazione responsabile del 50% della morte cellulare) è risultata di 5.83mmol/L, di conseguenza è stato deciso di testare la concentrazione di 3mmol/L, considerata non tossica a livello di vitalità cellulare. Precedenti studi hanno dimostrato l'esistenza di vari valori di TC50, riferiti all'HEMA, differenti al nostro (Ratanasathien et al., 1995; Geurtsen et al., 1998; Bouillaguet et al., 2000). Rakich e collaboratori (1998), ad esempio, hanno calcolato un valore TC50 di 10mmol/L per l'HEMA, dopo aver esposto macrofagi e monociti THP-1 per un tempo di 24h, mentre un altro studio ha riportato un valore di 3.6mmol/L HEMA, ottenuto utilizzando la linea cellulare 3T3 di fibroblasti di topo (Bouillaguet et al., 1996). Queste differenze nei valori di tossicità danno altre conferme sulla relazione esistente tra la tossicità dei monomeri e la sensibilità delle diverse linee cellulari (Bouillaguet et al., 2000). Tuttavia il grado di tossicità ottenuto nel nostro studio, con le nostre condizioni sperimentali, è molto più simile a quello riportato nei seguenti lavori (Moharamzadeh et al., 2007; Issa et al., 2004).

Secondo Spagnuolo e collaboratori (2006) il rilascio dell'HEMA dagli adesivi dentinali polimerizzati ha valori compresi tra 1.5mmol/L e 8mmol/L. Come precedentemente dimostrato, questo rilascio è molto elevato nelle prime 24h, poi diminuisce, ma si mantiene costante, per lunghi periodi di tempo (Çetingüç et al., 2007; Gerzina et al., 1996).

Lo scopo dello studio è stato quello di simulare *in vitro* gli effetti di questo rilascio, testando concentrazioni più basse della

TC50 e per tempi lunghi d'esposizione, valutando in seguito la morfologia e l'attività cellulare.

In seguito è stato eseguito un secondo saggio dell'MTT esponendo le HGFs alla concentrazione scelta di 3mmol/L HEMA per diversi tempi: 0h, 24h, 72h e 96h (fig. 1(b)). Dal grafico si può vedere che la vitalità cellulare inizia a decrescere dopo 72h di trattamento, ciò significa che già a questa concentrazione il monomero HEMA è in grado di agire negativamente sull'attività proliferativa delle cellule. Questi nostri risultati sono in accordo con lavori precedenti nei quali è dimostrato l'andamento esponenziale tra la tossicità dell'HEMA ed il tempo d'esposizione (Bouillaguet et al., 1996, 2000).

Utilizzando il microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FEISEM) è stata studiata la morfologia solo delle HGFs, dopo esser state esposte all'HEMA. I campioni trattati per 72h hanno mostrato un leggero cambiamento nella morfologia cellulare. Diversamente, i trattati di 96h erano caratterizzati da HGFs prive della tipica morfologia allungata dei fibroblasti; avevano forma irregolare e processi cellulari più rarefatti, i quali normalmente ricoprono la superficie delle cellule non trattate. In letteratura sono presenti molti articoli che hanno studiato la morfologia delle cellule dopo essere state esposte ai materiali dentari. Costa e collaboratori (1999; 2003), lavorando con la linea cellulare di odontoblasti immortalizzati (MDPC-23), hanno osservato una forte riduzione nel numero delle cellule cresciute sul substrato ed un rilevante cambiamento nella morfologia cellulare (Falconi et al., 2007).

In seguito sono stati ricercati eventuali effetti tossici del monomero a livello della traduzione e della trascrizione mediante l'applicazione di tecniche quali la RT-PCR, per quanto riguarda la traduzione, l'immunofluorescenza ed il Western Blotting, per la trascrizione. Ci siamo concentrati specialmente su proteine

specifiche delle nostre linee cellulari, HGFs e HPFs, come il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e la tenascina.

Il pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I è stato studiato sia nelle HGFs, dopo esser state esposte alla concentrazione di 3mmol/L per 0h, 24h, 72h e 96h sia nelle HPFs, dopo il loro trattamento con 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L per 0h, 72h, 96h e 1 settimana. L'immunofluorescenza ha rivelato una specifica marcatura della proteina pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I localizzata attorno al nucleo nei campioni non trattati. Questa tipica disposizione è collegata alla presenza del reticolo endoplasmatico rugoso in prossimità della membrana nucleare, a livello del quale le proteine sintetizzate completano il processo di maturazione (Leblond, 1989). Nei campioni trattati per 24h il segnale fluorescente diminuisce e diffonde nel citoplasma, mentre scompare quasi totalmente con l'avanzare dell'esposizione. Infatti nei trattati per 72h e 96h è stata osservata una forte riduzione del segnale. I nostri dati sono in accordo con studi precedenti, secondo i quali i monomeri resinosi, valutati esclusivamente con tecniche d'immunocitochimica, sono in grado di agire sull'espressione del collagene di tipo I, della osteonectina e della dentin sialoprotein (DSP) (About et al., 2005).

La riduzione del segnale fluorescente potrebbe essere una diretta interazione tra il monomero HEMA e la proteina pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I oppure un'interferenza tra l'HEMA e l'espressione del trascritto (mRNA) della proteina. Nishiyama e collaboratori (2002, 2003) hanno esaminato le caratteristiche di assorbimento dell'HEMA al collagene e hanno suggerito una diretta interazione tra i gruppi carbonilici esteri del monomero ed il gruppo carbossilico acido indissociato della proteina. Questa interazione potrebbe essere responsabile di una modificazione della struttura terziaria del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I determinando una riduzione dell'affinità con l'epitopo specifico presente sull'anticorpo primario.

La riduzione nell'espressione proteica osservata nei campioni trattati con HEMA potrebbe essere una diretta conseguenza dell'azione del monomero sul mRNA. Per dimostrare ciò è stata eseguita una RT-PCR, la quale ha mostrato una diminuzione della traduzione del gene del pro-collagene dopo 24h d'esposizione ed una quasi totale scomparsa del trascritto dopo 72h e 96h (submitted per una pubblicazione in JBMR, Teti et al., 2008).

In letteratura non sono presenti studi che dimostrano qualche effetto diretto dell'HEMA sulla trascrizione di specifiche proteine dell'ECM. Si può quindi ipotizzare che la riduzione del mRNA è causa di una possibile interazione tra il monomero ed il DNA. Infatti, Dearfield e collaboratori (1991) hanno suggerito che monomeri quali HEMA ed il TEGDMA siano in grado di causare parziali delezioni nel genoma delle cellule di mammifero legandosi al DNA. Questa azione potrebbe indurre genotossicità (Lee et al., 2006; Schweikl et al., 2001).

In contemporanea alle ricerche condotte sulle HGFs, abbiamo eseguito quelle sulle HPFs, osservando risposte diverse alla presenza dell'HEMA. Con questa linea cellulare abbiamo voluto abbassare le concentrazioni da testare del monomero e allungare i tempi d'esposizione per poter mimare il più possibile il rilascio che avviene nel tempo, all'interno della cavità orale. Prima di tutto è stato eseguito un test dell'MTT sulle HPFs dopo averle esposte a tre concentrazioni diverse: 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L per differenti tempi 0h, 72h, 96h e 1 settimana. Dal grafico è possibile notare che la concentrazione 0.5mmol/L, dopo 96h di trattamento, non ha effetti notevoli sulla vitalità cellulare (dato superiore al 50%), mentre questo parametro non raggiunge il 50% nei campioni trattati fino ad 1 settimana.

In seguito sono state condotte tecniche d'immunofluorescenza e di western blotting per poter visualizzare eventuali effetti dell'HEMA sulla sintesi del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e della

tenascina, due principali proteine della matrice extracellulare. I risultati ottenuti in entrambe le tecniche sono in accordo tra loro. L'analisi al western blot del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I ha evidenziato una diminuzione della sintesi correlata all'aumentare del tempo d'esposizione e della concentrazione del monomero. In particolare nei campioni trattati per 72h e alla concentrazione 1mmol/L è stata rilevata una debole banda corrispondente alla proteina. Dopo 1 settimana di trattamento e per tutte le concentrazioni testate, il segnale è totalmente assente. L'immunofluorescenza sulla stessa proteina ha confermato questi dati, evidenziando una scomparsa quasi completa della marcatura nei campioni esposti fino ad 1 settimana.

In un nostro lavoro precedente (Falconi et al., 2007) avevamo dimostrato che l'HEMA, alla concentrazione 3mmol/L dopo 96h, ha un effetto inibitorio sulla sintesi del pro-collagene. In questo studio, dimostriamo che l'effetto inibitorio è ancora presente, per maggiori tempi d'esposizione e a concentrazioni ancora più basse (0.5mmol/L e 1mmol/L), considerando sempre i valori teorici del possibile rilascio *in vivo* dei monomeri dalle matrici polimerizzate. Questi dati confermano, quindi, che la tossicità dei monomeri dipende dalla concentrazione, alla quale entrano in contatto con i tessuti, e dal tempo d'esposizione.

Diversamente dal pro-collagene, la proteina tenascina ha rivelato un comportamento opposto, una volta analizzata al western blot e all'immunofluorescenza.

I risultati ottenuti, infatti, mostrano un aumento della sintesi dipendente dalla concentrazione e dal tempo di trattamento. In particolare, il segnale della proteina è chiaramente visibile nei campioni trattati con 1mmol/L per 96h ed in tutte le concentrazioni testate fino ad 1 settimana. La stessa immunofluorescenza ha confermato questi dati, evidenziando un aumento del segnale specialmente in tutti i campioni trattati per il tempo più lungo (Zago et al., 2008).

Il nostro lavoro basato sullo studio degli effetti tossici dell'HEMA a diverse concentrazioni ha dimostrato che HEMA, a 0.5mmol/L, 1mmol/L e 3mmol/L e per i tempi testati, non è in grado di indurre morte cellulare, ma può causare modificazioni a livello della superficie cellulare delle HGFs e alterare l'attività delle cellule (HGFs e HPFs), come l'espressione del trascritto e la sintesi proteica. Queste alterazioni possono essere responsabili di vari danni cellulari, causando l'insorgenza di patologie. Ad esempio, secondo David e Bernfield (1981) la proteina collagene di tipo I potrebbe essere coinvolta nell'assemblaggio dei proteoglicani della lamina basale per stabilizzare i componenti della ECM. Il meccanismo mediante il quale il collagene riduca la degradazione dei proteoglicani e promuova quindi le interazioni tra gli elementi della matrice non è ancora completamente conosciuto. In accordo con i nostri dati, abbiamo ipotizzato che una riduzione nella sintesi del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I nelle cellule della polpa possa causare un aumento della degradazione di queste molecole proteiche della ECM e, quindi, determinarne una minore stabilità e integrità.

I dati che hanno, invece, mostrato un aumento dell'espressione della tenascina possono farci ipotizzare che l'HEMA sia una molecola in grado di creare una condizione di stress cellulare. Infatti, vari studi hanno dimostrato che la tenascina è una delle principali proteine della ECM coinvolta nel processo di guarigione delle ferite (Chiquet-Ehrismann, 1990) ed in diverse condizioni di stress meccanico e patologico (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003), correlate ad infiammazioni irreversibili o tumori nel tessuto connettivo. In accordo con questi lavori, i nostri dati suggeriscono che l'HEMA, anche alla concentrazione bassa di 0.5mmol/L per tempi lunghi (fino ad 1 settimana), è in grado di determinare una condizione stressante per le HPFs e ciò potrebbe provocare, col procedere del tempo, l'insorgenza di patologie.

Partendo da questi risultati, attualmente stiamo testando il monomero a concentrazioni ancora più basse (concentrazione 0.1mmol/L rilevata negli studi sul rilascio dei monomeri dalle resine polimerizzate (Moharamzadeh et al., 2007; Polydorou et al., 2007)), per tempi più lunghi: 15 giorni e 30 giorni. Lo scopo di questi test è quello di trovare la concentrazione di HEMA incapace di agire sulla vitalità cellulare e sulla traduzione/trascrizione. Dati preliminari sembrano dimostrare che il monomero resinoso testato sulle HPFs, nella concentrazione di 0.1mmol/L e per un mese d'esposizione, non provoca nessun danno alle cellule. La vitalità cellulare si mantiene del 100% e la traduzione/trascrizione del pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I e della tenascina non risultano alterate.

In conclusione questa ricerca ha dimostrato che il monomero resinoso HEMA, testato a concentrazioni comunemente ritenute non tossiche, per i nostri tempi d'esposizione, è in grado di determinare una riduzione dell'espressione e della sintesi della proteina pro-collagene $\alpha 1$ di tipo I. Inoltre l'HEMA, alle concentrazioni testate, è in grado di indurre una condizione di stress cellulare, evidenziabile con l'aumento dell'espressione della tenascina, una proteina della matrice extracellulare, la cui presenza è stata associata a sofferenza cellulare e a specifiche patologie.

I dati ottenuti con lo studio morfologico, immunocitochimico e con quello di biologia molecolare hanno dimostrato un perfetto parallelismo con piena concordanza e complementarietà delle informazioni ottenute.

I risultati che abbiamo ottenuto dimostrano che si possono identificare metodiche e markers proteici molto più sensibili rispetto a quelli attualmente utilizzati.

Questo risulta molto importante dato che le resine utilizzate sono destinate a restare in stretto contatto con i tessuti umani per diversi anni.

6. BIBLIOGRAFIA

- About I, Camps J, Burger AS, Mitsiadis TA, Butler WT, Franquin JC. (2005). *Polymerized bonding agents and the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells.* Dent Mater.; 21: 156-63.
- Ahmad R, and Stannard JG. (1990). *Mercury release from amalgam: a study in vitro and in vivo.* Oper. Dent.; 15: 207-18.
- Aumailley M, and Smyth N. (1998). *The role of laminins in basement membrane function.* J. Anat.; 193: 1-21.
- Bosman FT, and Stamenkovic I. (2003). *Functional structure and composition of the extracellular matrix.* J Pathol.; 200: 423-8.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. (1996). *In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA.* J. Endod.;22:244-8.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, Gonzalez L, Rakich DR, Meyer JM. (2000). *Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte macrophages, in vitro.* Dent Mater.;16:213-7.
- Boyer DB. (1988). *Mercury vaporization from corroded dental amalgam.* Dent. Mater.; 4: 89-93.
- Bristow J, Tee MK, Gitelman SE, Mellon SH, Miller WL. (1993). *Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B.* J Cell Biol.; 122: 265-78.

-
- Burch GH, Gong Y, Liu W, Dettman RW, Curry CJ, Smith L, Miller WL, Bristow J. (1997). *Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome.* Nat. Genet.; 17: 104-8.
- Çetingüç A, Olmez S, Vural N. (2007). *HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro.* Dent. Mater.; 23: 302-7.
- Chan KC, and Svare CW. (1972). *Mercury vapor emission from dental amalgam.* J. Dent. Res.; 51: 555-9.
- Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH. (2005). *Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA.* Biomaterials; 26: 745-753.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. (1986). *Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis.* Cell.; 47: 131-9.
- Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M. (1988). *Tenascin interferes with fibronectin action.* Cell.; 53: 383-90.
- Chiquet-Ehrismann, R. (1990). *What distinguishes tenascin from fibronectin?* FASEB Journal; 4: 2598-2604.
- Chiquet-Ehrismann R. (1995). *Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins.* Experientia.; 51: 853-62.
- Chiquet-Ehrismann R, and Chiquet M. (2003). *Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress.* J. Pathol.; 200: 488-499.

-
- Chiquet-Ehrismann R, and Tucker RP. (2004). *Connexive tissues: signalling by tenascins*. IJBCB; 36: 1085-1089.
- Chiquet-Ehrismann R. (2004). *Tenascins*. IJBCB; 36: 986-990.
- Colognato H, and Yurchenco PD. (2000). *Form and function: the laminin family of heterotrimers*. Dev. Dyn.; 218: 213-34.
- Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. (1999). *Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23*. Dent Mater.; 15: 434-41.
- Costa CA, Mesas AN, Hebling J. (2000). *Pulp response to direct capping with an adhesive system*. Am J Dent.; 13: 81-7.
- Costa CA, Giro EM, do Nascimento AB, Teixeira HM, Hebling J. (2003a). *Short-term evaluation of the pulp-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities*. Dent Mater.; 19: 739-46.
- Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. (2003b). *In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements*. Biomaterials.; 24: 3853-8.
- Coury AJ. (1996). *Chemical and biochemical degradation of polymers*. In: Biomaterials science. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. San Diego, CA: Academic Press. Inc., pp. 243-259.
- Craig RG. (1997). *Restorative dental materials*. Ed. 10. St. Louis: Mosby – Year Book, Inc.
- David G, and Bernfield M. (1981). *Type I collagen reduces the degradation of basal lamina Proteoglycan by mammary epithelial cells*. Journal of Cell Biology; 91: 281-286.

-
- De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. (2005). *A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results.* J Dent Res; 84: 118-32.
- Dearfield KL, Harrington-Brock K, Doerr CL, Rabinowitz JR, Moore MM. (1991). *Genotoxicity in mouse lymphoma cells of chemicals capable of Michael addition.* Mutagenesis.; 6: 519-25.
- Elefteriou F, Exposito JY, Garrone R, Lethias C. (1997). *Characterization of the bovine tenascin-X.* J Biol Chem.; 272: 22866-74.
- Erickson HP, and Bourdon MA. (1989). *Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors.* Annu Rev Cell Biol.; 5: 71-92.
- Falconi M, Teti G, Zago M, Pelotti S, Breschi L, Mazzotti G. (2007). *Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts.* Cell Biology and Toxicology; 23: 313-322.
- Ferracane JL, and Condon JR. (1990). *Rate of elution of leachable components from composite.* Dental Materials; 6: 282-287.
- Fotos PG, Diaz-Arnold AM, Williams VD. (1990). *Effect of microbial contamination and pH changes in storage solutions during in vitro assays of bonding agents.* Dent. Mater.; 6: 154-7.
- Freund M, and Munksgaard EC. (1990). *Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro.* Scand J Dent Res.; 98: 351-5.

-
- Fuss B, Pott U, Fischer P, Schwab ME, Schachner M. (1991). *Identification of a cDNA clone specific for the oligodendrocyte-derived repulsive extracellular matrix molecule J1-160/180.* J Neurosci Res.; 29: 299-307.
- Fuss B, Wintergerst ES, Bartsch U, Schachner M. (1993). *Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin.* J Cell Biol.; 120: 1237-49.
- Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. (2005). *Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials.* J Endod.; 31: 396-9.
- Genco RJ, and Slots J. (1984). *Host responses in periodontal diseases.* J. Dent. Res.; 63: 441-51.
- Gerzina TM, and Hume WR. (1995). *Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro.* J Dent Res.; 74: 369-73.
- Gerzina TM, and Hume WR. (1996). *Diffusion of monomers from bonding resin- resin composite combinations through dentine in vitro.* J Dent.; 24: 125-8.
- Geurtsen W. (1998). *Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements.* Eur J Oral Sci.; 106: 687-95.
- Geurtsen W. (2000). *Biocompatibility of resin-modified filling materials.* Crit Rev Oral Biol Med.; 11: 333-55.
- Goda T, and Ishihara K. (2006). *Soft contact lens biomaterials from bioinspired phospholipid polymers.* Expert Review of Medical Devices; 3: 167-174.

-
- Goldberg M, Lasfargues JJ, Legrand JM. (1994). *Clinical testing of dental materials-histological considerations.* J. Dent.; 22: S25-8.
- Gressner AM, and Bachem MG. (1994). *Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm.* Ann. Biol. Clin. 52, 205-226.
- Gulcher JR, Nies DE, Alexakos MJ, Ravikant NA, Sturgill ME, Marton LS, Stefansson K. (1991). *Structure of the human hexabrachion (tenascin) gene.* Proc Natl Acad Sci U S A.; 88: 9438-42.
- Hebling J, Giro EM, Costa CA. (1999). *Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp.* J Endod.; 25: 676-82.
- Hulmes DJ. (1992). *The collagen superfamily--diverse structures and assemblies.* Essays Biochem.; 27: 49-67.
- Hulmes DJ. (2002). *Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures.* J. Struct. Biol.; 137: 2-10.
- Hynes RO. (1990). *Fibronectins.* New York: Springer-Verlag.
- Ikuta T, Sogawa N, Ariga H, Ikemura T, Matsumoto K. (1998). *Structural analysis of mouse tenascin-X: evolutionary aspects of reduplication of FNIII repeats in the tenascin gene family.* Gene.; 217: 1-13.
- Ikuta T, Ariga H, Matsumoto K. (2000). *Extracellular matrix tenascin-X in combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation.* Genes Cells.; 5: 913-927.

-
- Innes DBK, and Youdelis WV. (1963). *Dispersion strengthened amalgam.* J. Can. Dent. Assoc.; 29: 587-593.
- Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. (2004). *Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro.* Dental Materials; 20: 12-20.
- Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. (2003). *TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts.* J Dent Res.; 82: 814-8.
- Johnson KJ, Sage H, Briscoe G, Erickson HP. (1999). *The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions.* J. Biol. Chem.; 274: 15473-9.
- Jokstad A, Thomassen Y, Bye E, Clench-Aas J, Aaseth J. (1992). *Dental amalgam and mercury.* Pharmacol. Toxicol.; 70: 308-13.
- Jones DW. (1999). *Exposure or absorption and the crucial question of limits for mercury.* J. Can. Dent. Assoc.; 65: 42-6.
- Jones FS, and Jones PL. (2000). *The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling.* Dev Dyn.; 218: 235-59.
- Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. (1997). *Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease.* Am J Pathol.; 150: 1349-60.
- Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. (1995). *Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory*

cells derived from the rat incisor pulp. J Dent Res.; 74: 1162-7.

Kaarteenaho-Wiik R, Tani T, Sormunen R, Soini Y, Virtanen I, Pääkkö P. (1996). *Tenascin immunoreactivity as a prognostic marker in usual interstitial pneumonia. Am J Respir Crit Care Med.; 154: 511-8.*

Kao EC. (1989). *Influence of food-simulating solvents on resin composites and glass-ionomer restorative cement. Dent. Mater.; 5: 201-8.*

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

Leblond CP. (1989). *Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. Anat Rec.; 224: 123-38.*

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. (2006). *Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. Dental Materials; 22: 1086-1092.*

Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. (1995). *The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. Int. J. Prosthodont.; 8: 122-8.*

Lindor NM, and Bristow J. (2005). *Tenascin-X deficiency in autosomal recessive Ehlers-Danlos syndrome. Am. J. Med. Genet. A.; 135: 75-80.*

Lord MS, Stenzel MH, Simmons A, Milthorpe BK. (2006). *The effect of charged groups on protein interactions with poly(HEMA) hydrogels. Biomaterials; 27: 567-575.*

-
- Lundell A, Olin AI, Mörgelin M, al-Karadaghi S, Aspberg A, Logan DT. (2004). *Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: evidence for a crosslinking role for tenascins.* Structure.; 12: 1495-506.
- Mackert JR Jr, and Wahl MJ. (2004). *Are there acceptable alternatives to amalgam?* J Calif Dent Assoc.; 32: 601-10.
- Mackie EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R. (1987). *Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro.* J Cell Biol.; 105: 2569-79.
- Mackie JE, Halfter W, Liverani D. (1988). *Induction of tenascin in healing wounds.* J. Cell. Biol.; 107: 2757-2767.
- Mahler DB. (1997). *Discovery! The high-copper dental amalgam alloys.* J. Dent. Res.; 76: 537-541.
- Mair LH. (1991). *Effect of surface conditioning on the abrasion rate of dental composites.* J. Dent.; 19: 100-6.
- Martinez EF, and Araujo VC. (2004). *In vitro expression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts.* Int. Endod. J.; 37: 749-755.
- McCachren SS, and Lightner VA. (1992). *Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1.* Arthritis Rheum.; 35: 1185-96.
- Mei N, Chen G, Zhou P, Chen X, Shao ZZ, Pan LF, Wu CG. (2005). *Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan--the fibroblasts proliferation in vitro.* Journal of Biomaterials Applications; 19: 323-339.
- Michelsen VB, Moe G, Skålevik R, Jensen E, Lygre H. (2007). *Quantification of organic eluates from polymerized resin-based*

dental restorative materials by use of GC/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.; 850: 83-91.

Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, Copeland NG, Sanes JR. (1997). *The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. J. Cell. Biol.; 137: 685-701.*

Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. (2007). *Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. Dental Materials; 23: 40-44.*

Mosher DF. (1993). *Assembly of fibronectin into extracellular matrix. Curr. Opin. Struct. Biol.; 3: 214-222.*

Munksgaard EC, and Freund M. (1990). *Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. Scand. J. Dent. Res.; 98: 261-7.*

Myllyharju J, and Kivirikko KI. (2001). *Collagens and collagen-related diseases. Ann. Med.; 33: 7-21.*

Nicolò M, Cardillo Piccolino F, Zardi L, Giovannoni A, Mariotti C. (2002). *Individuazione della tenascina-C in membrane neovascolari coroidali apertate chirurgicamente. Ottica Fisiopat.; 7: 187-192.*

Nishiyama N, Suzuki K, Komatsu K, Yasuda S, Nemoto K. (2002). *A 13C NMR study on the adsorption characteristics of HEMA to dentinal collagen. J Dent Res.; 81: 469-71.*

Nishiyama N, Suzuki K, Nagatsuka A, Yokota I, Nemoto K. (2003). *Dissociation states of collagen functional groups and*

their effects on the priming efficacy of HEMA bonded to collagen. J Dent Res.; 82: 257-61.

Nocca G, De Palma F, Minacci A, De Sole P, Martorana GE, Calla C, Morlacchi C, Gozzo ML, Gambarini G, Chimenti C, Giardina B, Lupi A. (2007). *Alterations of energy metabolism and glutathione levels of HL-60 cells induced by methacrylates present in composite resins.* Journal of Dentistry; 35: 187-194.

Nörenberg U, Wille H, Wolff JM, Frank R, Rathjen FG. (1992). *The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, fibronectin type III-, and fibrinogen-like motifs.* Neuron.; 8: 849-63.

Oberhauser AF, Marszalek PE, Erickson HP, Fernandez JM. (1998). *The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin.* Nature.; 393: 181-5.

Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. (2001). *Collagen structure and functional implications.* Micron.; 32: 251-60.

Pankov R, and Yamada KM. (2002). *Fibronectin at a glance.* J. Cell. Sci.; 115: 3861-3.

Pas J, Wyszko E, Rolle K, Rychlewski L, Nowak S, Zukiel R, Barciszewski J. (2006). *Analysis of structure and function of tenascin-C.* Int J Biochem Cell Biol.; 38: 1594-602.

Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. (1993). *Permeability of dentin to adhesive agents.* Quintessence Int.; 24: 618-31.

Pashley DH. (1996). *Dynamics of the pulpo-dentin complex.* Crit Rev Oral Biol Med.; 7: 104-33.

Pasqualino A, and Nesci E. (1998). *Anatomia Umana fondamentale.* Unione Tipografico- Editrice Torinese.

-
- Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. (2002). *Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis.* Semin. Cancer. Biol.; 12: 197-207.
- Peltonen J, Hsiao LL, Jaakkola S, Sollberg S, Aumailley M, Timpl R, Chu ML, Uitto J. (1991). *Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA.* J. Invest. Dermatol. 97, 240-248.
- Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kümmerer K. (2007). *Elution of monomers from two conventional dental composite materials.* Dent Mater.; 23: 1535-41.
- Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. (1998). *Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity.* J Endod.; 24: 528-33.
- Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. (1995). *Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts.* J Dent Res.; 74: 1602-6.
- Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R. (2006). *Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts.* Arch Toxicol.; 80: 370-7.
- Riedl SE, Faissner A, Schlag P, Von Herbay A, Koretz K, Möller P. (1992). *Altered content and distribution of tenascin in colitis, colon adenoma, and colorectal carcinoma.* Gastroenterology.; 103: 400-6.
- Santerre JP, Shajii L, Leung BW. (2001). *Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products.* Crit. Rev. Oral. Biol. Med.; 12: 136-51.

-
- Schafer TE, Lapp CA, Hanes CM, Lewis JB, Wataha JC, Schuster GS. (1999). *Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro.* J Biomed Mater Res.; 45: 192-7.
- Scherberich A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D, Chiquet-Ehrismann R. (2004). *Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development.* J Cell Sci.; 117: 571-81.
- Schuster GS. (1990). *Oral microbiology and infectious disease.* 34th ed. Toronto, ON, Canada: BC Decker Inc., p. 472.
- Schwarzbauer JE, and Sechler JL. (1999). *Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly.* Curr. Opin. Cell. Biol.; 11: 622-627.
- Schweikl H, and Schmalz G. (1999). *Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells.* Mutat Res.; 438: 71-8.
- Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. (2001). *The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers.* J Dent Res.; 80: 1615-20.
- Sechler JL, Takada Y, Schwarzbauer JE. (1996). *Altered rate of fibronectin matrix assembly by deletion of the first type III repeats.* J. Cell Biol.; 134: 573-583.
- Shuttleworth CA, Berry L, Wilson N. (1980). *Collagen synthesis in rabbit dental pulp fibroblast cultures.* Archives of Oral Biology; 25: 201-205.
- Soini Y, Kamel D, Apaja-Sarkkinen M, Virtanen I, Lehto VP. (1993). *Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow.* J Clin Pathol. Mar; 46: 218-21.

-
- Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paternò R, Schweikl H, Avvedimento EV, Rengo S. (2004). *NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA.* J Dent Res.; 83: 837-42.
- Spagnuolo G, D'Antò V, Rengo S. (2006). *Citotossicità dei monomeri dentari.* G. It. Cons.; 1: 18-32.
- Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. (1998). *Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry.* J Dent.; 26: 137-45.
- Spencer AJ. (2000). *Dental amalgam and mercury in dentistry.* Aust. Dent. J.; 45: 224-34.
- St John KR. (2007). *Biocompatibility of dental materials.* Dent Clin North Am.; 51: 747-60.
- Svare CW, Frank CW, Chan KC. (1973). *Quantitative measure of mercury vapor emission from setting dental amalgam.* J. Dent. Res.; 52: 740-3.
- Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Hiraishi N, Yiu CK. (2005). *Water treeing in simplified dentin adhesives--deja vu?* Oper Dent; 30: 561-79.
- Teti G, Mazzotti G, Zago M, Ortolani M, Breschi L, Pelotti S, Ruggeri A. Jr, Falconi M. (2008) *HEMA down-regulates procollagen $\alpha 1$ type I in human gingival fibroblasts.* J Biomat Med Research; Submitted.
- Unemori M, Matsuya Y, Akashi A, Goto Y, Akamine A. (2001). *Composite resin restoration and postoperative sensitivity: clinical follow-up in an undergraduate program.* J Dent.; 29: 7-13.

-
- Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. (2007). *Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives*. *Biomaterials.*; 28: 3757-85.
- Weber P, Montag D, Schachner M, Bernhardt RR. (1998). *Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family*. *J Neurobiol.*; 35: 1-16.
- Wierzbicka-Patynowski I, and Schwarzbauer JE. (2003). *The ins and outs of fibronectin matrix assembly*. *J. Cell. Sci.*; 116: 3269-76.
- Yoshida K, and Greener EH. (1993). *Effects of two amine reducing agents on the degree of conversion and physical properties of an unfilled light-cured resin*. *Dent. Mater.*; 9: 246-51.
- Zacharias U, Nörenberg U, Rathjen FG. (1999). *Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member F11 are differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-R and tenascin-C*. *J Biol Chem.*; 274: 24357-65.
- Zago M, Teti G, Mazzotti G, Ruggeri A, Breschi L, Pelotti S, Ortolani M, Falconi M. (2008). *Expression of procollagen $\alpha 1$ type I and tenascin proteins induced by HEMA in human pulp fibroblasts*. *Toxicology in vitro*. In press.
- Zambon JJ, Nakamura M, Slots J. (1985). *Effect of periodontal therapy on salivary enzymatic activity*. *J. Periodontal. Res.*; 20: 652-9.