



***“Effetti dei metilacrilati, presenti in
resine composite, sul metabolismo
energetico e sullo stato redox di cellule
pulpari umane”***

Laureanda: Carlotta Arcangeli

Matricola: 1095652

Relatore: Prof. Rino Ragno

Correlatore: Prof. Giuseppina Nocca

Prof. Alessandro Lupi

Tesi svolta presso:

Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Direttore: Prof. M. Castagnola

Resine composite per uso odontoiatrico

Negli anni '50 vengono gradualmente introdotte le resine acriliche polimerizzabili, materiali il cui colore e traslucenza si accostano molto bene a quelli dello smalto dei denti

IMPIEGO:

- ✓ **Sigillanti di fessure formatesi sulla superficie dei denti**
- ✓ **Materiali per otturazioni**
- ✓ **Materiali per il restauro dentale**

Vantaggi

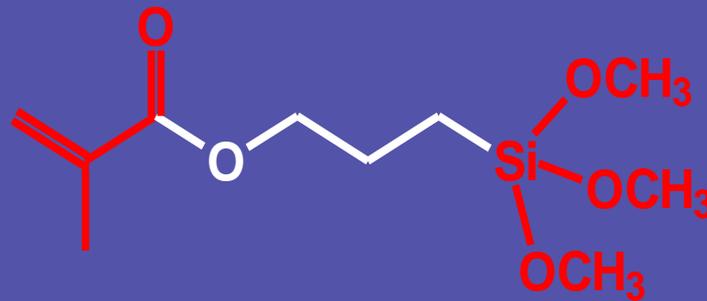
- Facile modellabilità
- Buon impatto estetico
- Elevata resistenza alla compressione, alla frattura ed alla trazione

Svantaggi e Problematiche

- Limitata resistenza all'usura
- Rilascio dei monomeri nella cavità orale
- Effetti avversi soprattutto a livello locale

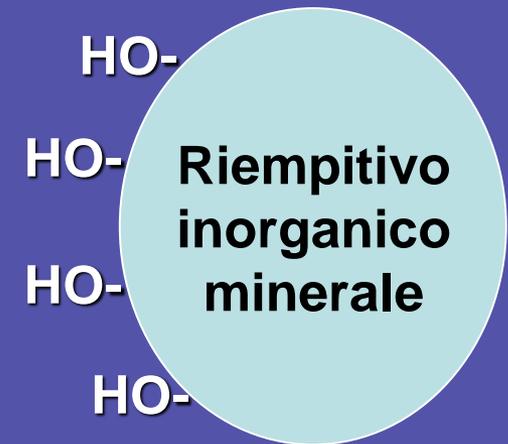
La composizione

Matrice organica



Agente legante
(3-Metacrilossipropil-trimetossisilano)

40-50 % del
volume del
materiale



70 ÷ 80 % in peso,
50 % circa in volume

Resine composite per uso odontoiatrico

Matrice organica

**Monomeri ed oligomeri
metilacrilici**

Le proprietà della matrice organica sono determinate dalla natura chimica dei componenti e dal processo di polimerizzazione chimica o fotochimica

Altri componenti

Iniziatori

Acceleratori

Inibitori

Assorbitori UV

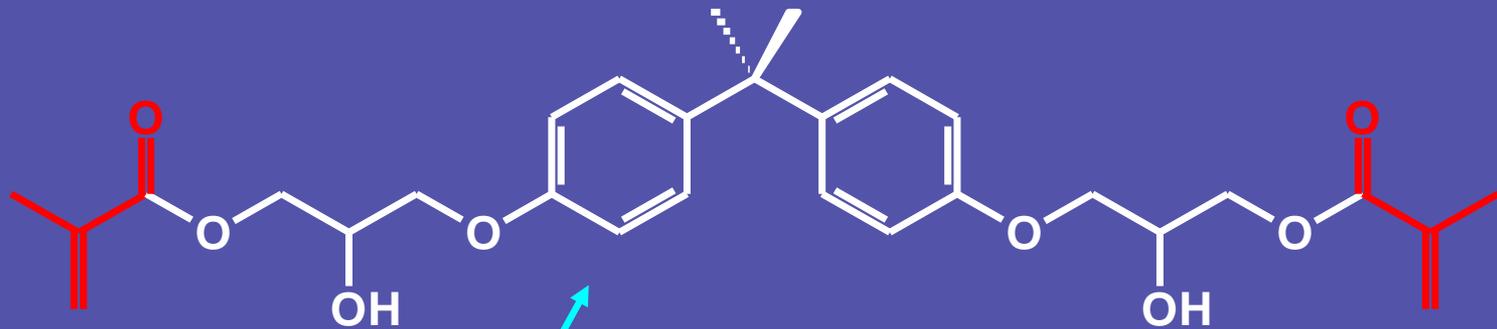
Pigmenti

Additivi

Resine composite per uso odontoiatrico

Bisfenolo A glicerolato dimetilacrilato Bis-GMA

(Monomero di Bowen, 1956)



Rigidità e resistenza
alla trazione

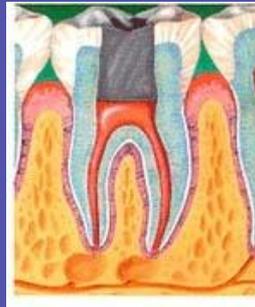
Legami idrogeno ed
aumento di viscosità

Problematiche legate all' uso di resine composite

Nella pratica odontoiatrica le resine vengono sottoposte ad un processo di polimerizzazione



Grado di conversione dei doppi legami durante la polimerizzazione sempre < 100%



Dentina

Polpa dentaria



Contatto dei monomeri con cellule dell'organismo



Inevitabile rilascio di monomeri nelle cavità orale e pulpare.

Effetti tossici provocati dai monomeri su linee cellulari stabili

- **Alterano il metabolismo energetico cellulare**
- **Stimolano la produzione di specie reattive dell'ossigeno**
- **Inducono una diminuzione della concentrazione totale di glutathione**

Scopo del lavoro

Determinazione di:

1. Grado di conversione ed entità del rilascio di monomeri da campioni fotopolimerizzati di resina composita.
2. Effetti *in vitro* dei monomeri sul metabolismo energetico cellulare.
3. Effetti *in vitro* sul metabolismo redox cellulare.

Parte 1°

**Preparazione di dischi di
materiale polimerizzato
(Filtek™ Supreme)**



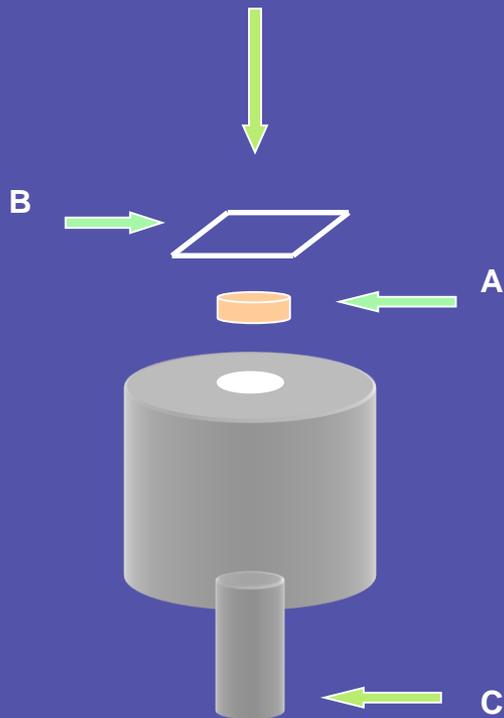
**Grado di conversione
dei doppi legami
(FT-IR in ATR)**



**Rilascio di monomeri
metilacrilici
(HPLC)**

Preparazione dei campioni di materiale polimerizzato

Sorgente luminosa



Sorgenti luminose e
modalità di illuminazione:

- **Lampada alogena:**

- irraggiamento costante
- irraggiamento incrementale

- **Lampada L.E.D.:**

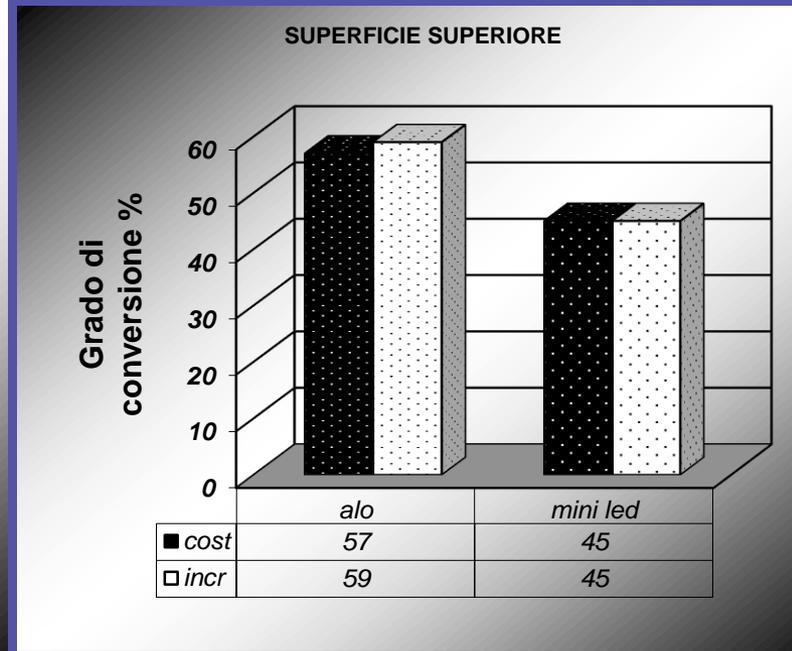
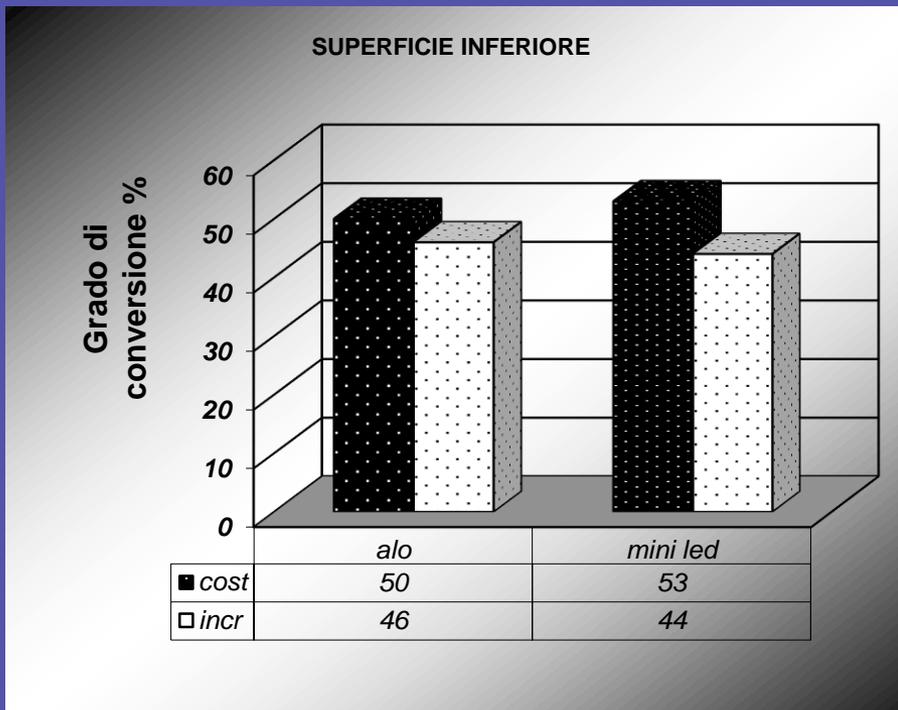
- irraggiamento costante
- irraggiamento incrementale

A: *campione di resina*
B: *matrice trasparente*
C: *pistone*

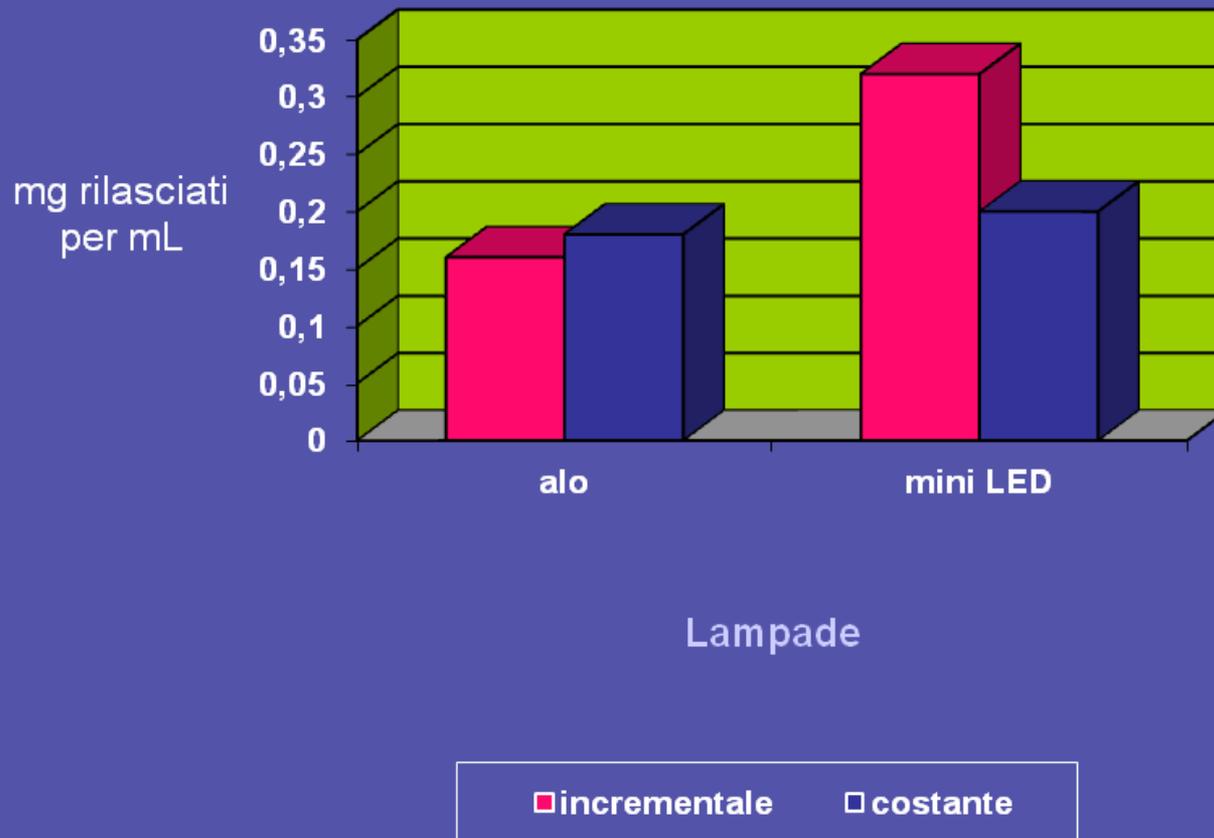
Determinazione del grado di conversione tramite FT-IR in ATR

- ❖ Superficie del disco analizzata: **superiore ed inferiore**
- ❖ Segnali considerati:
 - stretching del doppio legame C=C dei gruppi metilacrilici (1640-1635 cm⁻¹)
 - stretching del doppio legame C=C dell'anello aromatico (1640-1605 cm⁻¹)

$$\text{Grado di conversione \%} = 100 - \frac{100 \cdot [A_{\text{met}} / A_{\text{arom}}] \text{ polimero}}{100 \cdot [A_{\text{met}} / A_{\text{arom}}] \text{ monomero}}$$



Determinazione del rilascio di HEMA tramite HPLC



Incremento statisticamente significativo del rilascio di HEMA dai campioni polimerizzati in modalità incrementale con la lampada mini LED, rispetto alle altre condizioni sperimentali.

Condizioni sperimentali degli studi *in vitro*

Coltura primaria: Human Pulpar Cells (HPC), ottenute con il consenso informato del paziente sano e con l'approvazione del Comitato Etico.

Terreno: **Dulbecco's Modified Eagles' Medium (DMEM)**
con l'aggiunta di:

- siero di vitello fetale (FCS) 10%
- L-glutammina (2 mM)
- streptomina (100,0 mg / ml)
- penicillina (1000 unità / ml)

Incubazione: a 37 °C; 95% aria, 5% CO₂

Esperimenti eseguiti in quadruplicato, ripetuti 3 volte

Valutazione della citotossicità tramite saggio MTT

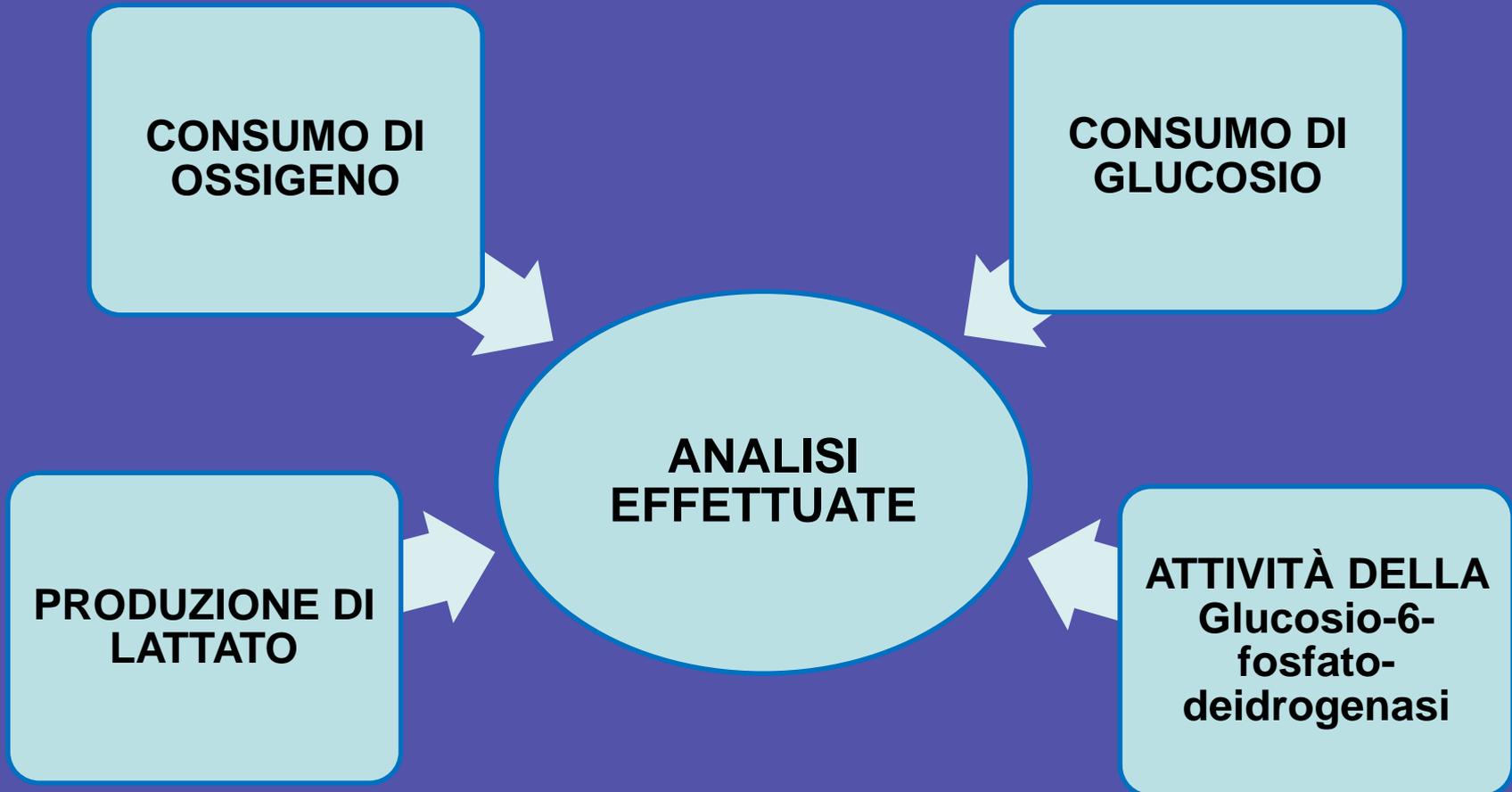
Il saggio MTT valuta l'azione di xenobiotici sull'attività dell'enzima mitocondriale SUCCINATO DEIDROGENASI

$$\text{mortalità cellulare} = \frac{\text{DO controllo} - \text{DO campione}}{\text{DO controllo}}$$

Soluzioni di **METILACRILATI** a concentrazioni **SUB-CITOTOSSICHE**:

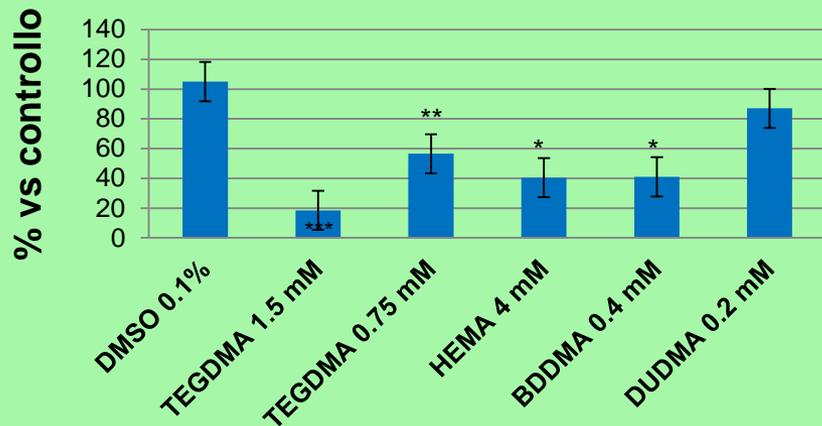
- HEMA: 4,00 mM,
- TEGDMA: 1,50 mM e 0,77 mM
- DUDMA: 0,20 mM
- BDDMA: 0,40 mM

Studio del metabolismo energetico cellulare

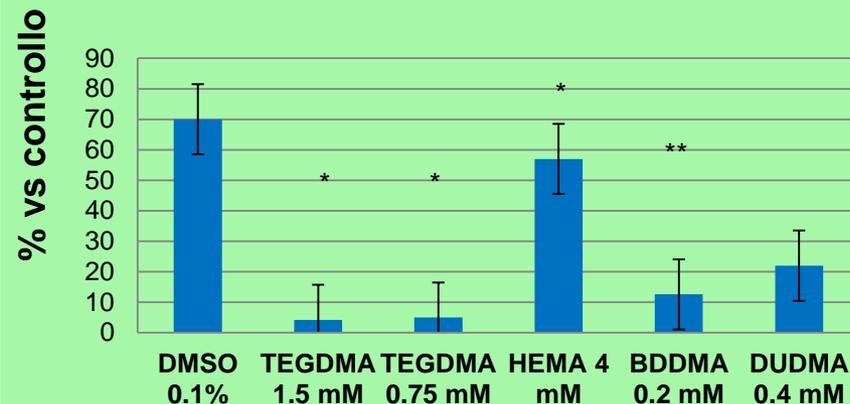


Analisi del consumo di ossigeno cellulare

Studi di respirazione cellulare 4h



Studi di respirazione cellulare 24 h



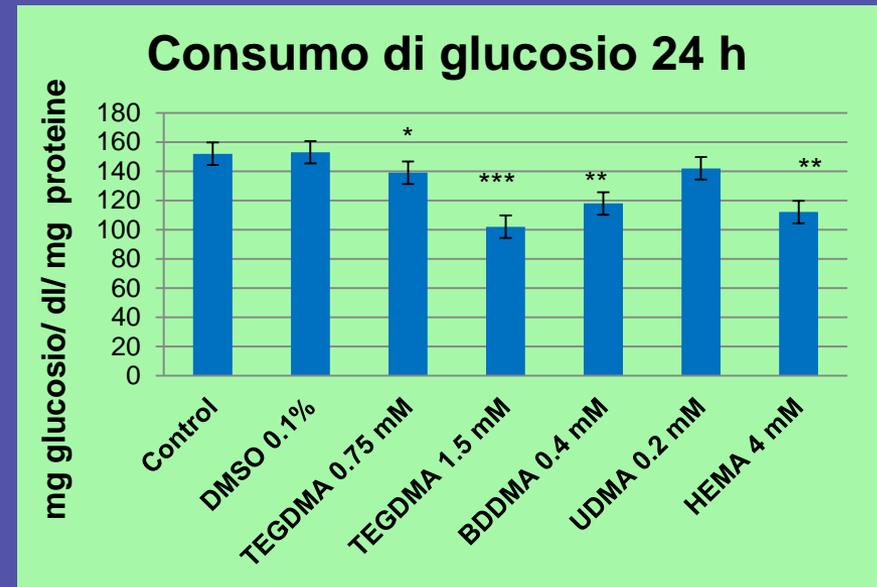
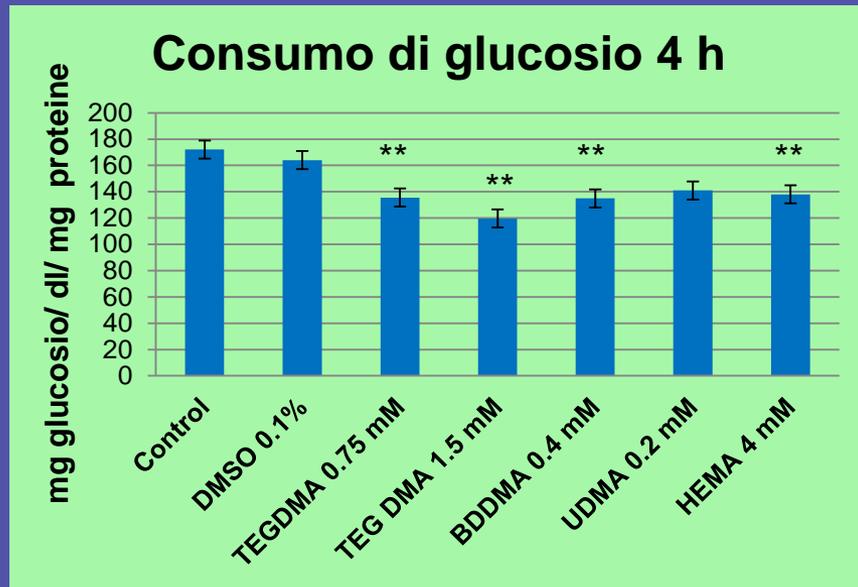
LEGENDA:

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

TECNICA: OSSIGRAFIA *Oxygen meter Model 781, Strathkelvin Instruments, UK*

RISULTATO: riduzione della velocità del consumo di ossigeno nelle cellule trattate con TEGDMA, HEMA e BDDMA → probabilmente dovuta ad un danno mitocondriale

Analisi del consumo di glucosio cellulare



LEGENDA:

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

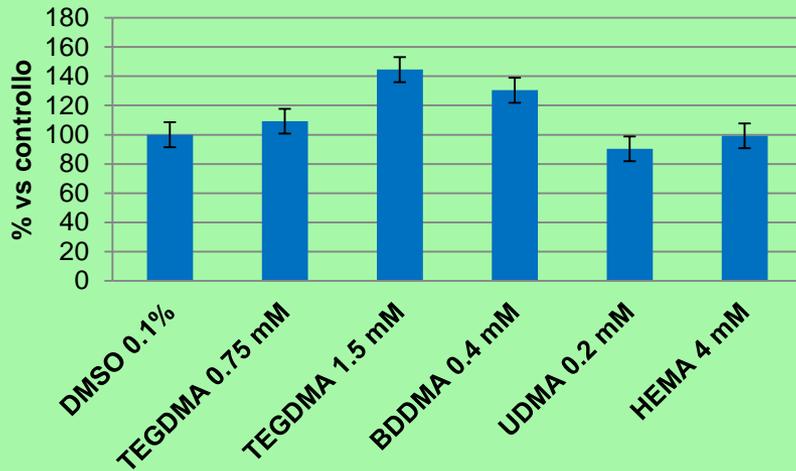
TECNICA: TEST ENZIMATICO FOTOMETRICO GOD-PAD

RISULTATO: aumento del consumo di glucosio da parte delle cellule trattate con HEMA, TEGDMA e BDDMA.

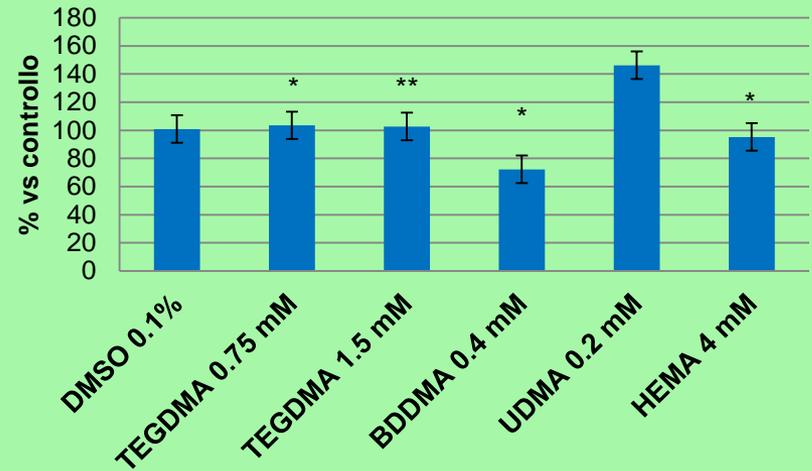
Attraverso quale via metabolica viene consumato il glucosio?

Analisi della produzione di lattato

Produzione di lattato 4h



Produzione di lattato 24 h



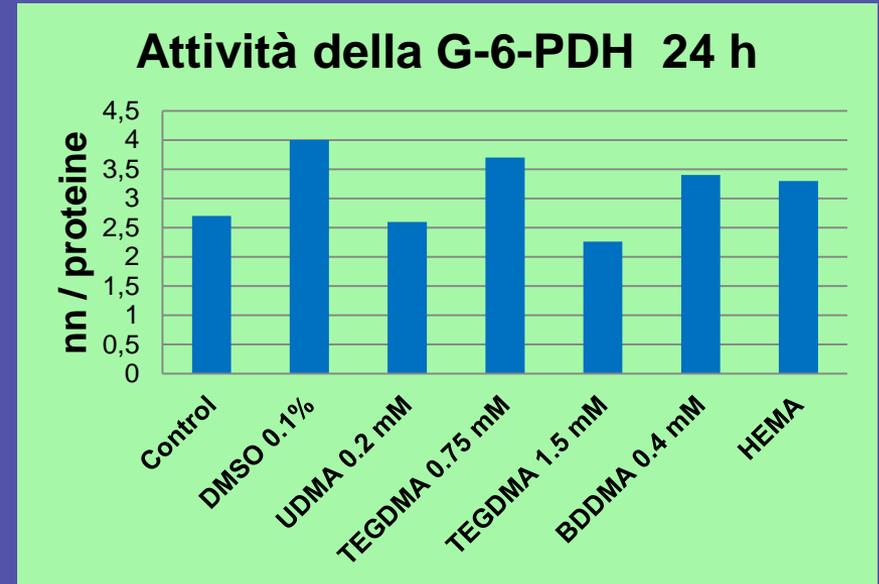
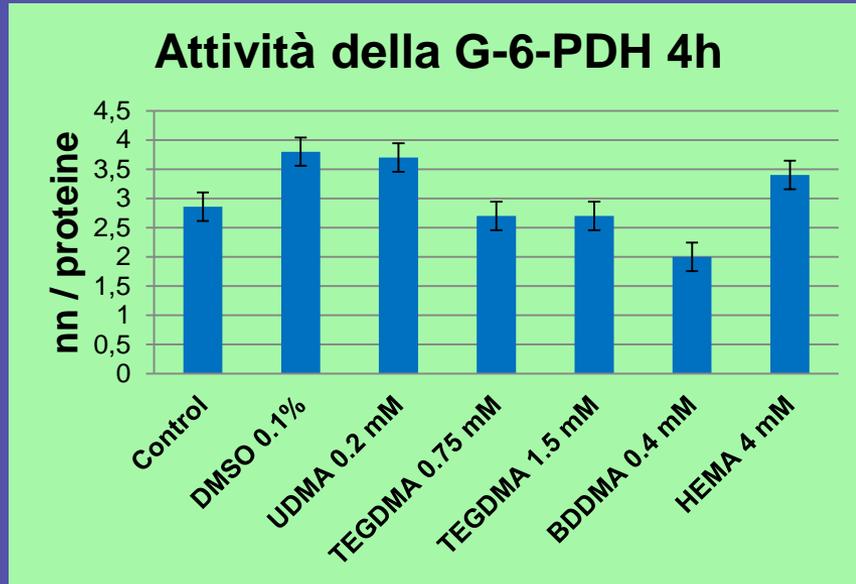
LEGENDA:

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

TECNICA: TEST ENZIMATICO ROCHE – DIAGNOSTIC

RISULTATO: Dopo 24 ore di incubazione, la concentrazione di lattato è aumentata nelle cellule trattate con HEMA, TEGDMA e BDDMA.

Analisi dell'attività della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi



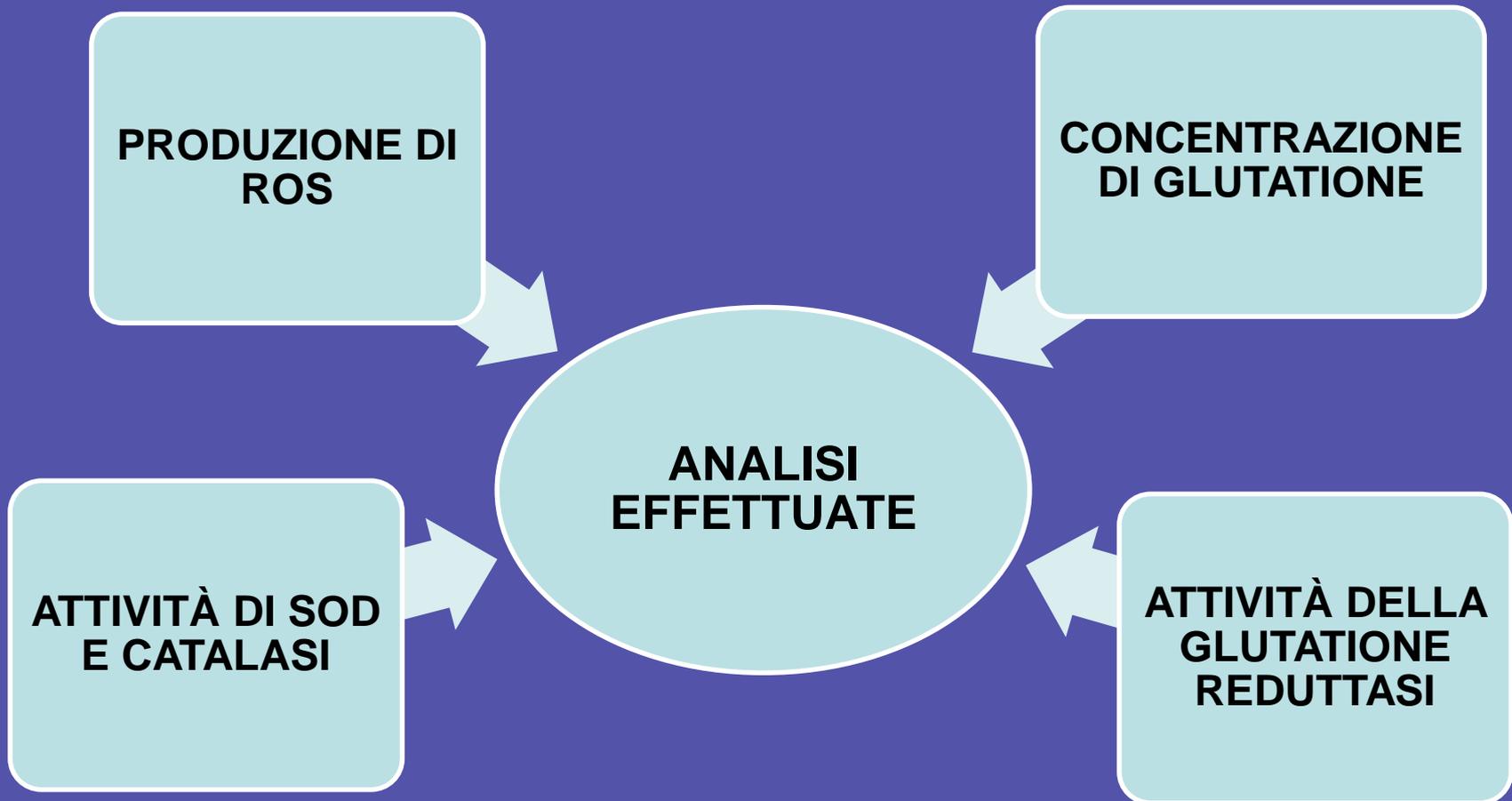
TECNICA DI ANALISI: SPETTROFOTOMETRIA (340 nm)

RISULTATO: l'attività della G-6-PDH in tutte le cellule trattate risulta inalterata



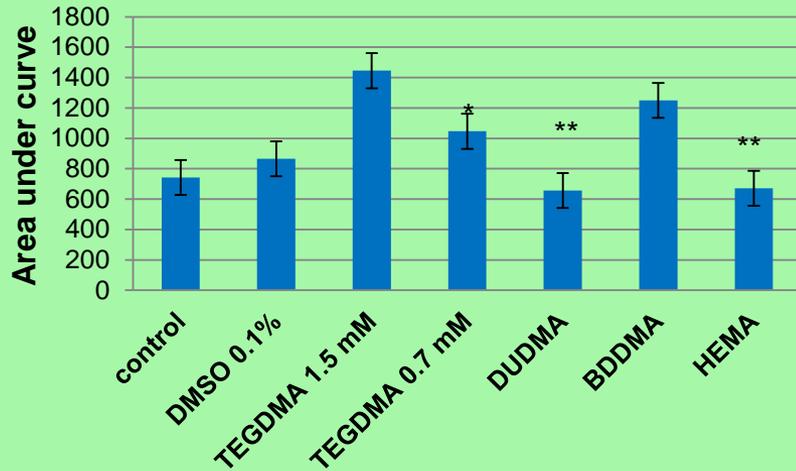
non è presente alcuna alterazione nella via metabolica dei pentoso fosfati

Studio dello stato REDOX cellulare

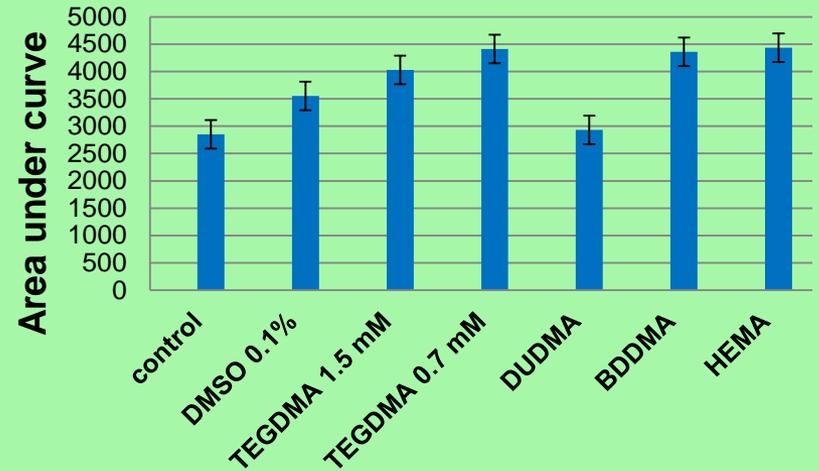


Analisi della produzione di ROS

Produzione di ROS 4 h



Produzione di ROS 24 h



LEGENDA:

*** p < 0,001 ** p < 0,01 * p < 0,05

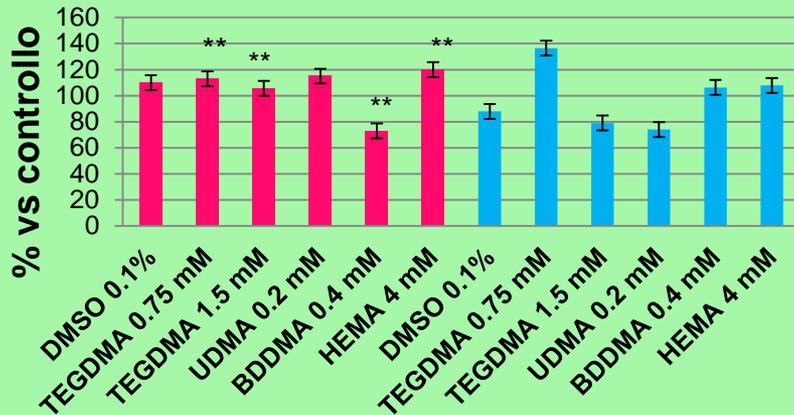
TECNICA DI ANALISI: FLUORIMETRIA

RISULTATI: incremento di produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno

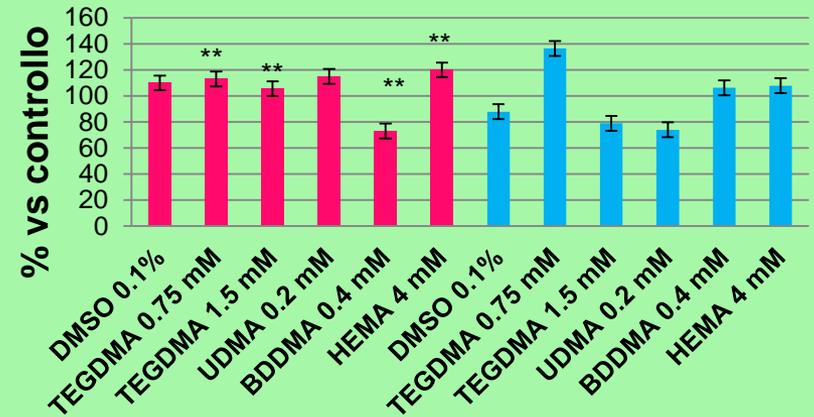
presumibilmente associabile ad un'alterata attività mitocondriale, come indicato dalla riduzione del consumo di ossigeno

Analisi della concentrazione di glutatione

Quantità di GSH ridotto



Quantità di GSH tot



LEGENDA:

*** p < 0,001 ** p < 0,01 * p < 0,05 ■ 4h ■ 24h

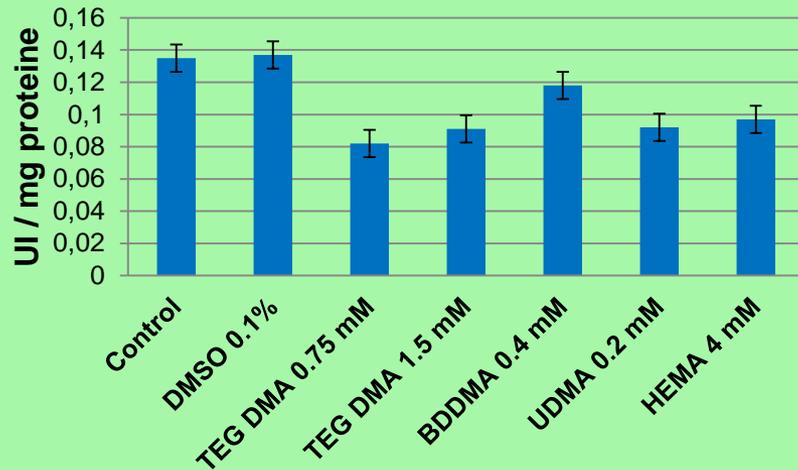
TECNICA DI ANALISI: METODO DI *ELLMAN*, MODIFICATO DA *WATAHA*

RISULTATI: HEMA, TEGDMA e BDDMA riducono sia la concentrazione di GSH che quella di GSSG.

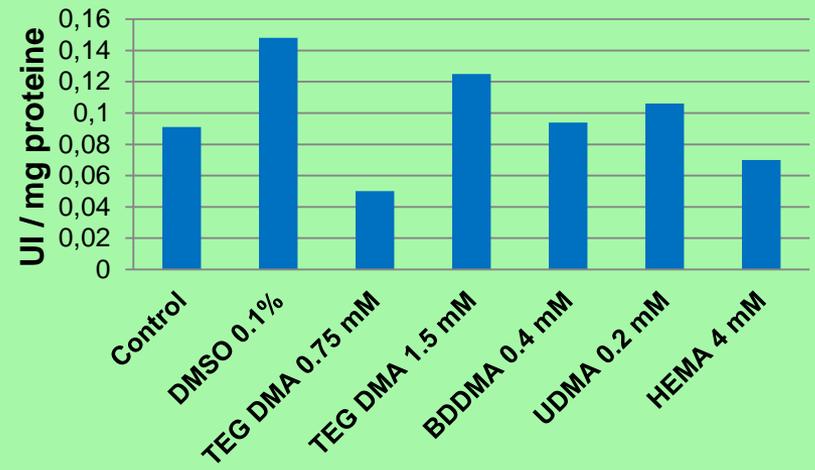
UTILIZZO DI GSH NELLA REAZIONE DI METABOLIZZAZIONE DI FASE II

Analisi dell'attività di glutatione reduttasi

Attività della GR 4 h



Attività della GR 24 h

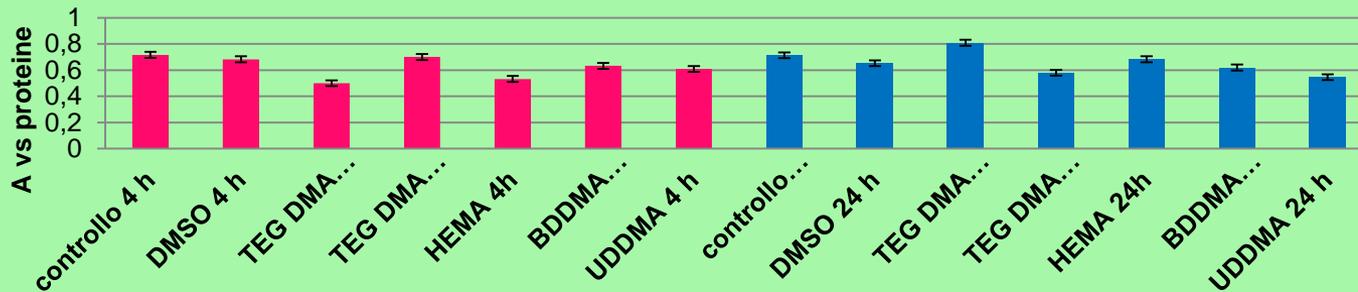


TECNICA: Saggio enzimatico secondo Carlberg e Mannervik

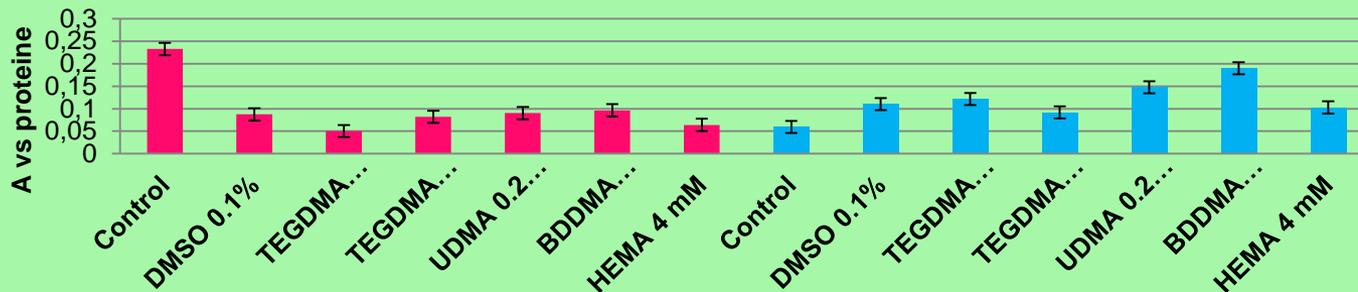
RISULTATI: assenza di alterazione dell'attività enzimatica di GR nelle cellule trattate.

Analisi dell'attività di SOD E CATALASI

Attività di CATALASI a 4 e 24 h



Attività di SOD a 4 e 24 h



TECNICA: Spettrofotometria

RISULTATO: nessuna alterazione dell'attività enzimatica

Conclusioni

Da quanto osservato possiamo concludere che:

- È evidente **un'alterazione del metabolismo energetico** delle cellule trattate con le soluzioni di monomeri, dimostrata da:
 - riduzione della velocità del consumo di ossigeno
 - incremento del consumo di glucosio
 - aumento della produzione di lattato.
 - inalterata attività enzimatica della G6PDH.
- È evidente un incremento della produzione di ROS, nonostante l'assenza di variazioni dell'attività enzimatica di SOD, CATALASI e GR

Prospettive future

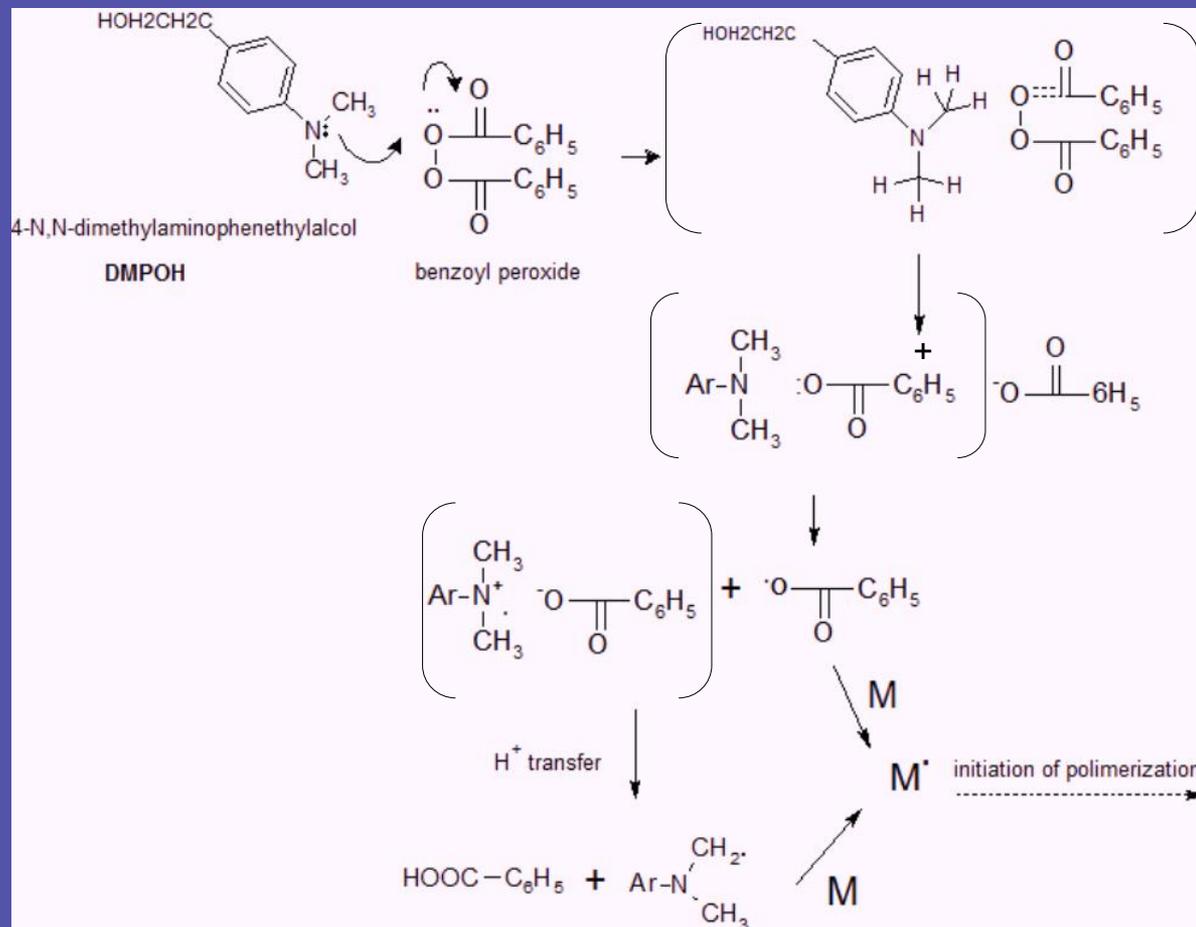
Da quanto esposto risulta evidente che sono ancora numerosi gli aspetti da chiarire tra cui, in particolare, le differenze di comportamento tra i vari monomeri, al fine di poter correlare struttura chimica ed effetti sul metabolismo.

Tutti i dati ivi ottenuti, oltre a chiarire i meccanismi d'azione dei monomeri, potrebbero fornire informazioni utili alle ditte produttrici per la realizzazione di materiali sempre più biocompatibili.

Grazie
per
l'attenzione

Reazione di polimerizzazione

1) POLIMERIZZAZIONE con coppia redox perossido di benzoile- 4-N,Ndimethylaminophenethylalcol



2) FOTOPOLIMERIZZAZIONE con Canforochinone

- $CQ \longrightarrow CQ\cdot$ **inizio polimerizzazione dei monomeri**
- $CQ\cdot + M \longrightarrow CQM\cdot$ ----->

