

Gianrico Spagnuolo
Vincenzo D'Antò
Colomba D'Ambrosio
Michele Simeone
Sandro Rengo

Università degli Studi di Napoli "Federico II"
Dipartimento di Scienze
Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali,
Cattedra di Odontoiatria Conservatrice
Titolare: Prof. Sandro Rengo

Corrispondenza:
Dott. Gianrico Spagnuolo
Via Pansini, 5
80100 Napoli
Tel. e Fax: 081 7462080
E-mail: gspagnuolo@unina.it

Pervenuto in Redazione il 12 giugno 2006
Accettato per la pubblicazione il 25 luglio 2006

Effetto del ProRoot™ MTA su cellule pulpari umane

Effect of ProRoot™ MTA on Human Pulp Cells

RIASSUNTO

Scopo: numerosi studi *in vivo* suggeriscono l'utilizzo del ProRoot™ MTA (*Mineral Trioxide Aggregate*) come materiale da utilizzare nella terapia della polpa vitale, sebbene gli effetti dell'MTA su cellule pulpari siano controversi. Pertanto, scopo del presente lavoro è stato quello di valutare *in vitro* l'effetto dell'MTA su cellule pulpari primarie umane.

Metodologia: fibroblasti pulpari primari (HPC) erano ottenuti da terzi molari estratti da pazienti giovani. L'MTA veniva preparato così come suggerito dalla casa produttrice, successivamente inserito sul fondo dei pozzetti di una *multiwell* da 24; dopo 20 minuti, in ciascun pozzetto venivano aggiunti 650 µl di DMEM e lasciati per 24h a 37°C. Le HPC venivano esposte a differenti diluizioni (1:1-1:10000) degli estratti di MTA. L'effetto dell'MTA sulla vitalità e sull'attività metabolica cellulare veniva valutato con il test dell'MTT (attività delle deidrogenasi mitocondriali). I parametri morfologici venivano analizzati tramite citometria a flusso e microscopia ottica.

Risultati: l'esposizione delle HPC all'MTA (diluizione 1:1) determinava un aumento della vitalità cellulare di circa il 25% rispetto al controllo, ma non influenzava la proliferazione. Al microscopio ottico la morfologia delle cellule incubate con MTA mostrava un aumento delle dimensioni del citoplasma accompagnato da formazione di granuli. Questo risultato era confermato anche dalla citometria a flusso.

Conclusioni: i risultati indicano che l'MTA induce un aumento dell'attività metabolica e della differenziazione delle HPC, ma non un incremento della proliferazione delle HPC.

Parole chiave:
MTA, cellule pulpari umane, proliferazione.

ABSTRACT

Aim: several *in vivo* studies reported the use of MTA for vital pulp therapy, while so far the MTA effects on primary dental pulp cells (HPC) are unclear. Therefore, the aim of our study was to evaluate the *in vitro* effects of ProRoot™ MTA on primary HPC.

Methodology: primary human dental pulp cells were obtained from patients undergoing routine extractions of third molars. White-colored MTA was prepared according to manufacturers' instructions and then inserted on the bottom of a 24-well dish. In each wells 650 µl of Medium were added for 24 hrs at 37°C. The HPC were stimulated by different dilutions (1:1-1:10000) of MTA eluates. The effect of MTA on the cell viability and mitochondrial activity was measured by MTT assay (mitochondrial dehydrogenase activity) and by optic microscopy.

Results: the stimulation of HPC by MTA eluates (dilution 1:1) determined a significant increase of mitochondrial dehydrogenase activity, but did not influence cell proliferation. Cell morphology, evaluated by phase contrast opti-

cal microscopy, showed cytoplasmic blow up and formation of several vesicles. These morphological changes was confirmed by flow cytometry.

Conclusions: results suggest MTA induce an increase of metabolic activity and cell differentiation, but not of proliferation of HPC.

Key words:
MTA, pulp cells, proliferation.

INTRODUZIONE

La pulpotomia deve essere considerata il trattamento di elezione in caso di esposizioni pulpari traumatiche, iatrogene o cariose al fine di preservare la vitalità pulpare di elementi dentari la cui formazione radicolare non è ancora completamente avvenuta.

All'interno del moncone pulpare residuo le cellule pulpari indifferenziate, trasformandosi in cellule simil-odontoblastiche, svolgono la loro funzione di produrre tessuto dentinale permettendo la fisiologica crescita radicolare, l'ispessimento delle pareti canalari e la chiusura dell'apice radicolare.

Gli elementi dentari normalmente sottoposti a pulpotomia sono soprattutto denti frontali traumatizzati e con esposizione pulpare in bambini di età compresa tra i cinque e i dodici anni. Laddove, infatti, si verifica una esposizione pulpare in denti la cui formazione radicolare risulta completata, l'unico trattamento terapeutico eseguibile è una corretta terapia canalare.

L'innovazione scientifico-mercológica

degli ultimi anni fornisce una continua immissione in commercio di nuovi materiali utili nella routine clinica-odontoiatrica, ponendo, talora, gli stessi operatori di fronte a difficoltà o problematiche di scelta.

In particolare, per la pulpotomia, la dicotomia è tra l'*idrossido di calcio*, materiale universalmente riconosciuto, affidabile ed efficace nella produzione del *dental bridge*, e *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA), un nuovo materiale dalle molteplici applicazioni in endodonzia (1).

Il *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA) è una polvere inodore derivata dal cemento Portland, costituita principalmente da piccole particelle idrofile di silicato tricalcico, di alluminato tricalcico, ossido tricalcico e ossido di silicio, oltre a piccole quantità di ossidi minerali che modificano le sue proprietà fisico-chimiche (2). È stata inoltre aggiunta polvere di ossido di bismuto che ne determina la radiopacità. Tale componente è l'unico che manca nel cemento di Portland, che sembra possa essere utilizzato al pari dell'MTA come materiale da otturazione degli apici radicolari, avendo d'altra parte il vantaggio di essere molto meno costoso (3).

In commercio sono presenti due formulazioni di MTA relativamente al colore: MTA grigio e MTA bianco. Sperimentalmente è stato dimostrato che il meccanismo d'azione dell'MTA bianco è simile a quello del classico MTA grigio, anche se clinicamente molti operatori riportano insuccessi relativamente all'impiego dell'MTA bianco, e in particolare lamentano un aumento del tempo di indurimento (4).

La polvere, miscelata con acqua sterile, dà per idratazione un gel colloidale denso e granuloso con pH iniziale di 10.2. Una volta indurito, dopo tre ore il pH risale a un valore di 12.5, simile a quello dell'idrossido di calcio (2); questo potrebbe spiegare le proprietà antimicrobiche dell'aggregato (5).

Il materiale presenta un'ottima biocompatibilità (6, 7) e un'ottima capacità sigillante (8, 9), motivo per cui MTA è considerato materiale ideale da utilizzare in caso di riparazioni delle perforazioni del pavimento della camera pulpale o dei canali radicolari.

Sebbene numerosi studi *in vitro* abbia-

no indagato l'effetto dell'MTA su veri fenotipi cellulari, sino ad oggi nessun Autore ne ha valutato gli effetti su cellule pulpari primarie, ma solo su cellule pulpari immortalizzate (10).

Pertanto, lo scopo del nostro lavoro è stato valutare l'effetto dell'MTA su cellule pulpari umane primarie, in particolare al fine di elucidare la biocompatibilità del materiale e l'eventuale capacità di indurre la progressione del ciclo cellulare.

MATERIALI E METODI

Cellule e reagenti

I fibroblasti della polpa (HPC) sono stati ottenuti da terzi molari estratti da pazienti giovani. Il tessuto pulpare veniva sminuzzato con un bisturi e i pezzi venivano lasciati in piastra per 10 giorni, fino a quando venivano allontanati. Le cellule ottenute venivano fatte crescere in *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM) con 10% *fetal calf serum* (FCS), 100U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomycin in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂ a 37°C e sub-coltivate fino al sesto passaggio. Tutti i reagenti utilizzati erano prodotti dalla InVitrogen (Italia).

Preparazione degli estratti e stimolazione delle cellule

Il Tooth-Colored ProRoot™ MTA (Dentsply, Italia) veniva preparato così come suggerito dalla casa produttrice e successivamente inserito sul fondo dei pozzetti di una *multiwell* da 24; dopo 20 minuti in ciascun pozzetto venivano aggiunti 650 µl di DMEM e lasciati per 24h a 37°C. Successivamente gli estratti di MTA venivano diluiti (1:1-1:10000) e messi a contatto con le HPC per differenti tempi.

Valutazione dell'attività mitocondriale

Il test MTT misura l'attività metabolica della cellula (respirazione mitocondriale), fornendoci di solito informazioni sulla vitalità della cellula. Le HPC veni-

vano piastrate in una *multiwell* da 96 pozzetti alla densità di 10.000 cellule per pozzetto. Dopo 24h il mezzo veniva rimosso e le cellule venivano incubate in assenza e in presenza delle varie diluizioni dell'eluato di MTA per 24, 48 e 72h. Al termine del periodo di incubazione in ogni pozzetto il mezzo veniva sostituito con 200 µl di soluzione di MTT (0,5 mg/ml - Sigma, Italia), preparato in PBS, e le cellule venivano incubate a 37°C per 1h in atmosfera umidificata contenente 5% CO₂. Dopo 1h la soluzione era rimossa e i cristalli di formazano insolubile formati all'interno delle cellule erano dissolti mediante l'aggiunta di 100 µl di DMSO (dimetilsolfossido, Sigma, Italia). La densità ottica veniva misurata in un lettore Bio-Rad ELISA ad una lunghezza d'onda di 540 nm. I risultati venivano espressi in percentuale rispetto alle cellule non trattate.

Analisi dei parametri morfologici

Il *citofluorimetro a flusso* è uno strumento che permette l'esame delle cellule in sospensione, che vengono analizzate mentre fluiscono di fronte a una sorgente laser. L'interazione del fascio di luce con la cellula dà luogo a tre fenomeni: *light scattering*, assorbimento e fluorescenza.

Lo *Scattering* comprende i fenomeni di diffusione, riflessione, rifrazione e diffrazione della luce. Una cellula colpita da un fascio luminoso emette segnali relativi alle sue *caratteristiche fisiche e morfologiche*. Se si osserva una cellula in controluce si misura un segnale legato soprattutto alla diffusione (*scatter*) che è funzione del diametro cellulare (*forward scatter* o diffusione a piccolo angolo); quindi il *forward scatter* ci fornisce informazioni riguardo la superficie della cellula fornendoci indicazioni riguardo le dimensioni cellulari. Se ci si pone ortogonalmente al fascio, si misura invece un segnale legato quasi esclusivamente alla riflessione ed alla rifrazione, che sono funzioni della granularità interna, del rapporto nucleo-citoplasma, della rugosità di superficie oltre che del diametro (*side scatter* o *scatter* a 10° o ad ampio angolo). La combinazione dei due tipi di segnali dà origine ad un particolare diagramma di dispersione deno-

minato citogramma (*Dot-plot*) nel quale è possibile risolvere le popolazioni cellulari in base alle sole caratteristiche fisiche.

Per indagare l'effetto dell'MTA sui cambiamenti cellulari indotti dopo 24h di trattamento, le HPC sono state analizzate tramite questa metodica (FAC-Scan, BD, USA). In particolare le dimensioni e la granulosità cellulare venivano valutate su *dot-plot* settando i parametri FSC e SSC (WinMDI 2.8 software). Inoltre i parametri morfologici venivano valutati anche con *microscopia ottica* (Zeiss, Italia).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati era ottenuta utilizzando *Mann-Whitney U-test*.

RISULTATI

L'esposizione delle HPC all'MTA (diluizione 1:1) determinava un aumento della vitalità cellulare, inteso come *attività delle deidrogenasi mitocondriali*, di circa il 25% rispetto al controllo ($p < 0.05$), mentre non si riscontravano differenze significative alle altre diluizioni. Inoltre la diluizione 1:1 era efficace in tutti i tempi studiati: 24, 48, 72h (Fig. 1).

L'osservazione al microscopio ottico non mostrava un numero maggiore di cellule rispetto al controllo. Le cellule esposte ad MTA sembravano addirittura essere in numero inferiore rispetto al controllo non trattato. Dopo trattamento non erano visibili cellule morte (Fig. 2). Interessante, la morfologia delle cellule incubate con MTA mostrava un aumento delle dimensioni del citoplasma e soprattutto la formazione di granuli (Fig. 3). Queste variazioni dimensionali e morfologiche sono state confermate anche dall'analisi al citofluorimetro. Lo spostamento della popolazione sia lungo l'asse SSC che FSC rappresentava, rispettivamente, l'aumento di granulosità e di dimensioni delle cellule (Fig. 4). La granulosità era quindi aumentata per la presenza di vacuoli, mentre un *blow-up* del citoplasma determinava un incremento delle dimensioni.

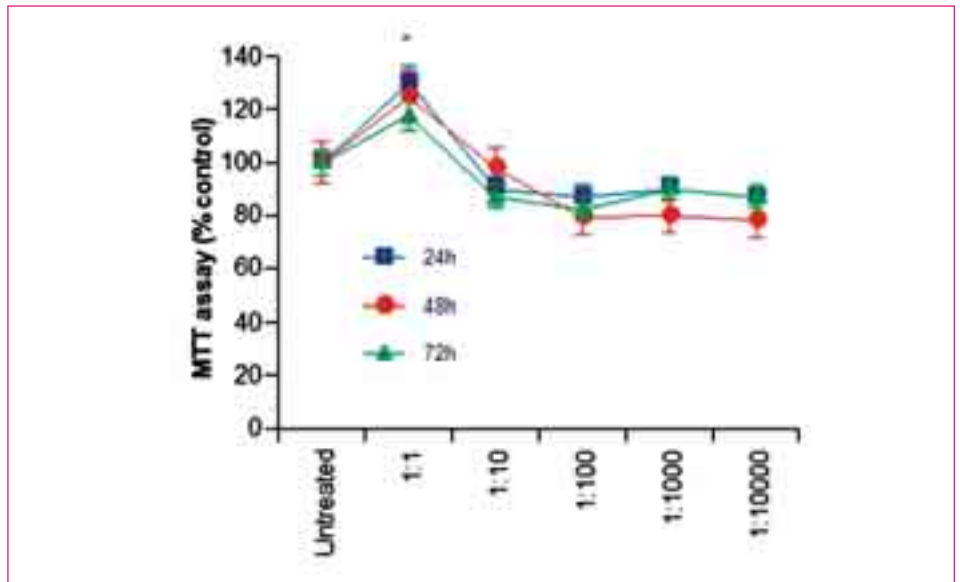


Fig. 1 - Attività mitocondriale delle cellule pulpari trattate con differenti diluizioni di MTA a vari tempi.

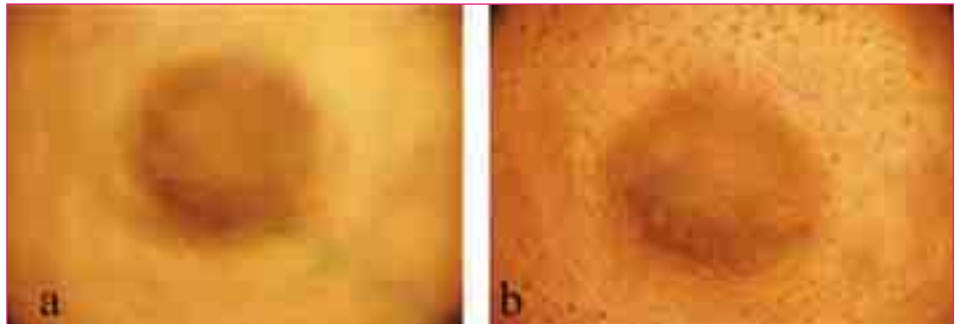


Fig. 2 - Microscopia ottica (ingrandimento 4x) di cellule pulpari umane a) non trattate o b) stimulate con MTA per 24h.

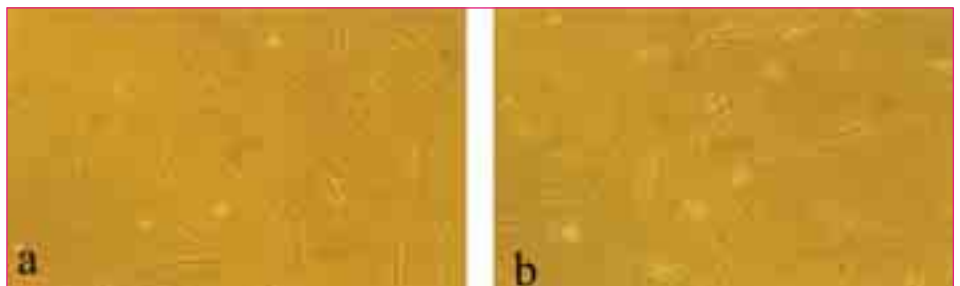


Fig. 3 - Microscopia ottica (ingrandimento 10x) di cellule pulpari umane a) non trattate o b) stimulate con MTA per 24h.

DISCUSSIONE

Dalla nostra esperienza clinica, il campo di applicazione elettivo dell'MTA è

relativo alle riparazioni delle perforazioni del pavimento della camera pulpare o dei canali radicolari, alle otturazioni retrograde e alle apicificazioni. Il suo utilizzo non trova la massima indicazione per la pulpotomia dal momento che

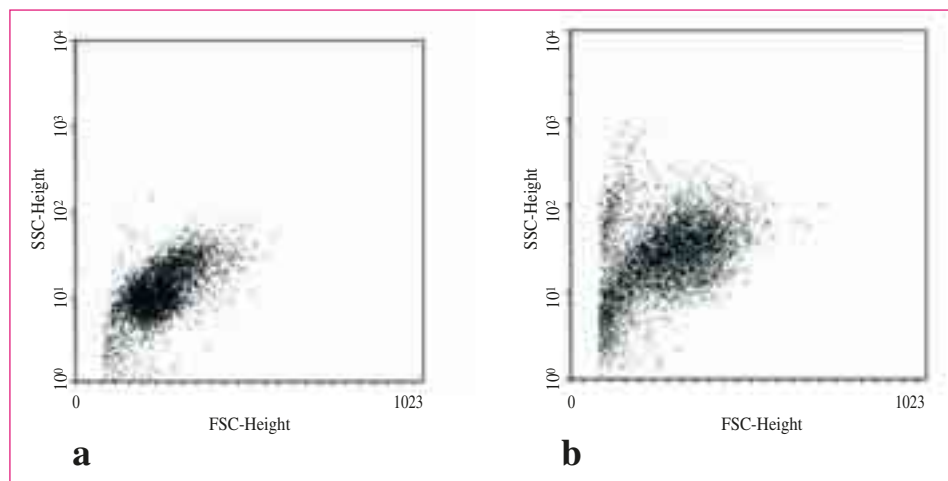


Fig. 4 - Parametri morfologici valutati con citometria a flusso. Cellule pulpari umane a) non trattate o b) stimulate con MTA per 24h.

la formazione del *dentinal bridge* richiede un periodo di tempo uguale o superiore rispetto a quello indotto dall'idrossido di calcio.

In contrasto con la nostra esperienza clinica, alcuni Autori affermano che MTA dia minore infiammazione e migliore formazione del ponte dentinale rispetto all'idrossido di calcio (11-13) secondo altri, invece non c'è alcuna differenza (14).

È stato proposto che il meccanismo d'azione dell'MTA presenti similitudini con quello dell'idrossido di calcio, in quanto sebbene l'MTA non contenga $\text{Ca}(\text{OH})_2$, esso tuttavia rilascia CaO e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Il CaO può reagire con i fluidi tissutali e dare a sua volta $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Questa ipotesi confermerebbe la sovrapposibilità del risultato clinico utilizzando i due materiali (15).

Nessuno studio *in vitro* ha, sino ad oggi, valutato il meccanismo d'azione dell'MTA su cellule pulpari primarie uma-

ne, sebbene la biocompatibilità sia stata ampiamente testata su numerose linee cellulari (16, 17).

Recentemente è stato dimostrato che l'MTA induce un lieve aumento della proliferazione di cellule odontoblastosimili (MDPC-23) e cellule pulpari indifferenziate (OD-21) (10). Questi esperimenti effettuati su linee cellulari immortalizzate ci hanno spinto ad investigare l'effetto dell'MTA su cellule pulpari umane primarie (HPC). In particolare, abbiamo utilizzato eluati per valutare la capacità dell'MTA di indurre effetti attraverso il rilascio di sostanze nel mezzo di coltura. L'osservazione al microscopio ottico ha confermato che non è presente alcun segno di morte cellulare, quale distacco delle cellule e arrotondamento, a dimostrazione della mancanza di tossicità su cellule pulpari (Fig. 2). D'altra parte, l'osservazione al microscopio ha mostrato dei cambiamenti morfologici significativi con au-

mento delle dimensioni citoplasmatiche e la comparsa di vacuoli di secrezione (Fig. 3). La presenza di vacuoli può essere un indice di stimolazione da parte del materiale alla produzione di proteine che sono rilasciate nella matrice extracellulare e che potrebbero essere coinvolte nei processi di riparazione tissutale.

L'aumento della vitalità valutata utilizzando l'MTT (Fig. 1), ottenuto previa esposizione all'eluato non diluito (1:1), è indice di un aumento dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali e quindi di un aumentato metabolismo cellulare, ma non di un incremento del numero delle cellule. Il mancato aumento del numero delle cellule trattate con MTA era evidente anche all'osservazione microscopica (Fig. 2). Pertanto, un aumentato metabolismo ed una ridotta crescita cellulare potrebbero indicare che MTA stimola le HPC verso una sintesi proteica piuttosto che verso una proliferazione cellulare.

Inoltre, Moghadamme-Jafari et al. (10) hanno riscontrato che l'aumento della proliferazione cellulare era significativo nelle cellule MDPC-23, ma non in quelle meno differenziate OD-21, supponendo che è richiesto un certo livello di competenza prima che le cellule possano rispondere allo stimolo proliferativo. Alla luce di questa ipotesi, l'effetto che noi riscontriamo sui fibroblasti pulpari indifferenziati può essere interpretato come un'acquisizione di competenza cellulare, al fine di assumere la capacità di produrre matrice extracellulare essenziale nel processo dentinogenico.

Pertanto, l'utilizzo *in vivo* di MTA sul tessuto pulpare potrebbe favorire i meccanismi di riparazione tissutale e la formazione del *dentinal bridge*.

BIBLIOGRAFIA

1. Torabinejad M. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *Alpha Omegan* 2004 Dec; 97(4):23-31.
2. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21(7):349-53.
3. Saidon J, He F, Zhu Q, Safavi K, Spang-

berg LS. Cell and tissue reaction to MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 9(4): 483-9.

4. Perez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. *Int*

Endod J 2003; 36(8):564-70.

5. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod* 1995; 21(8):403-6.

6. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kaiyawasam SP. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggre-

- gate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J Endod* 1995; 21(11):569-71.
7. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Adebil HR, Tang HM. Tibia and mandible reaction to implanted root-end filling materials. *J Endod* 1997; 23:263.
8. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995; 21(6):295-9.
9. Fischer EJ, Arens DE, Miller CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. *J Endod* 1998; 24(3):176-9.
10. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation *in vitro*. *J Endod* 2005; 31(5):387-91.
11. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using Mineral Trioxide Aggregate as a Pulp Capping Material. *JADA* 1996; 127:1491-4.
12. Koh ET, Ford TR, Kariyawasam SP, Chen NN, Torabinejad M. Prophylactic treatment of dens evaginatus using mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2001;27(8):540-2.
13. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2003; 36(3):225-31.
14. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 2002; 35(3):245-54.
15. Holland R, de Souza V, Nery MJ e coll. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999; 25(3):161-6.
16. Huang TH, Ding SJ, Hsu TC, Kao CT. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials* 2003; 24(22):3909-13.
17. Lin CP, Chen YJ, Lee YL, Wang JS, e coll. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 15;71(2):429-40.