

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
ODONTOSTOMATOLOGICHE E MAXILLO-FACCIALI**

**DOTTORATO IN SCIENZE ODONTOSTOMATOLOGICHE
XXIV CICLO**

Coordinatore: Prof. Sandro Rengo

Tesi di Laurea in Odontoiatria Restaurativa

**Effetto del Mineral Trioxide Aggregate su cellule
staminali mesenchimali**

TUTOR

Chiar.mo Prof.
Sandro Rengo

CANDIDATO

Dott.ssa
Maria Patrizia Di Caprio

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

1. Introduzione

2. Revisione della Letteratura

- 2.1 Caratteristiche chimico-fisiche dell'MTA
- 2.2 Proprietà meccaniche e adesive dell'MTA
- 2.3 Proprietà biologiche dell'MTA
 - 2.3.1 Capacità antibatteriche e antimicotiche
 - 2.3.2 Biocompatibilità
 - a) *Citotossicità e genotossicità*
 - b) *Proliferazione, espressione genica, produzione dei mediatori, induzione*
 - c) *Reazioni tissutali, formazione di una barriera calcificata*

3. Scopo della Tesi

4. Materiali e Metodi

5. Risultati

6. Discussione

7. Conclusioni

Referenze Bibliografiche

1. Introduzione

Il Mineral Trioxide Aggregate (MTA), sviluppato dalla Loma Linda University, è stato posto all'attenzione mondiale nel 1993, brevettato nel 1995 ed ha ricevuto l'approvazione della FDA statunitense nel 1998. Il brevetto dichiara che l'MTA è un cemento di Portland ordinario di Tipo I con in aggiunta l'ossido di bismuto come agente opacizzante. Esso è costituito per il 50-75% da ossido di calcio e il 15-25% da ossido di silicio. Quando i due materiali grezzi sono miscelati formano silicato tricalcico, silicato dicalcico, alluminato tricalcico, alluminoferrite tetracalcico. Con l'aggiunta di acqua il cemento idratato diventa un gel idrato di silicato (1).

L'MTA nasceva come materiale da otturazione retrograda, commercializzato come ProRoot™ MTA (Dentsply Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA), inizialmente nella sola versione grigia (GMTA). Si proponeva allora come una valida alternativa all'amalgama, al Super-EBA e all'IRM, materiali maggiormente usati in quel momento per l'otturazione retrograda. Le qualità di adattamento marginale, riduzione dell'attività batterica, minore attività infiammatoria periapicale rispetto ai materiali già in uso, hanno contribuito alla rapida diffusione dell'MTA in ambito clinico. Inoltre, la maneggevolezza, la semplice applicazione, nonostante il lungo tempo di indurimento, e la capacità di indurire anche in ambiente umido hanno spinto i clinici ad utilizzarlo per indicazioni terapeutiche diverse (2-6). Molteplici studi in vitro (4-8) e in vivo (8-15) hanno esaminato le ottime caratteristiche fisiche e biologiche del materiale, tra cui la scarsa solubilità, le buone qualità antibatteriche, la biocompatibilità, la scarsa citotossicità e la capacità di induzione degli odontoblasti e di una barriera calcificata (8,10-20) incoraggiandone l'uso per la terapia di perforazioni radicolari e lesioni delle forcazioni, frattura verticale di

radice, riassorbimenti nonché incappucciamento diretto, apicificazione e apicogenesi in elementi dentari non maturi (15, 19, 59, 21-35). Uno dei principali svantaggi dell'MTA grigio è di poter provocare un discolorimento, soprattutto quando utilizzato in zone in cui l'esigenza estetica è più sentita (31). Allo scopo di ovviare a questo problema è stato commercializzato l'MTA bianco (WMTA) (20, 31), che risulta essere più maneggevole e dal colore più simile a quello dei tessuti dentari. In seguito al successo commerciale ottenuto da tali prodotti, sono stati lanciati sul mercato diversi cementi a base Portland tra cui l'MTA-Angelus, (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brazil), Auroseal (Ogna Laboratori Farmaceutici, Monza, Italia), Tech Biosealer (Isasan, Rovello Porro, Italia).

2. Revisione della Letteratura

2.1 Caratteristiche chimico-fisiche dell'MTA

Le caratteristiche chimico-fisiche del MTA sono state oggetto di molteplici studi. Al microscopio elettronico l'MTA appare costituito da una fase amorfa ed una cristallina. La fase cristallina è costituita per l'87% di calcio, il 2,47% di ossido di silicio, per la restante parte da ossigeno. Nelle aree di struttura amorfa sono presenti, invece, per il 33% calcio, il 49% fosfati, il 2% carbonio, il 3% cloro, e il 6% ossido di ossido di silicio. La microanalisi elettronica rivela che gli ioni maggiormente presenti sono il calcio e il fosforo. Questo renderebbe l'MTA compatibile a contatto con cellule e tessuti. La polvere è costituita da particelle idrofile e nello specifico il silicato tricalcico, l'ossido tricalcico e l'ossido di silicio. Non mancano piccole percentuali di altri ossidi che contribuiscono a determinare le peculiari caratteristiche della polvere, modificando la struttura cristallina e la possibilità di reagire. L'ossido di bismuto è aggiunto per conferire maggiore radiopacità. L'MTA presenta il massimo rilascio di calcio a 3h, solidifica in circa 4h e raggiunge la massima resistenza alla compressione (70 MPa) dopo 21 giorni. Posto l'MTA in ambiente acido, esso incrementa la sua capacità di sigillo apicale. L'idratazione della polvere determina la formazione di una soluzione colloidale ed è possibile definire l'MTA indurito come idrossido di calcio in una matrice di silicati. Per quanto concerne il pH, esso varia in funzione del tempo ed è 10.2 dopo la miscelazione ed aumenta a 12.5 dopo 3 ore, rimanendo poi costante. La composizione chimica è sovrapponibile a quella del cemento di Portland, fatta eccezione per l'ossido di bismuto. Allo spettrometro a fluorescenza si valuta la presenza di CaO (58.5%), SiO₂ (17.7%), Al₂O₃ (4.5%), MgO (3.3%), SO₃ (3.0%), Fe₂O₃ (2.9%), K₂O (0.9%), Na₂O (0.2%) (2).

Il cemento di Portland, d'altronde, è costituito da silicati di calcio ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ e $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), alluminato di calcio ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$), alluminoferrite di calcio ($4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$), solfato di calcio idrato ($\text{CaO}\cdot\text{SO}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ossidi alcalini ed altri componenti (19).

Per quanto concerne le due versioni commerciali del ProRoot-MTA, la variante bianca e quella grigia, esistono differenze sia da un punto di vista chimico che di morfologia di superficie, anche in diverse condizioni (ambiente saturo di umidità, immersione in acqua e in soluzione di fosfati). L'analisi EDAX (Energy Dispersive Analysis by X-ray) al SEM, utilizzata per identificare gli elementi presenti sia prima che dopo l'indurimento, sottolinea che l'MTA bianco è composto primariamente da calcio e silicio oltre che da ossigeno e bismuto mentre quello grigio presenta in più ferro e alluminio. L'analisi XRD, utilizzata per valutare i composti e le fasi presenti mostra che l'MTA grigio è composto essenzialmente da silicato dicalcico, tricalcico, ossido di bismuto e piccole quantità di alluminato di calcio e alluminoferrite mentre quello bianco da silicato tricalcico e ossido di bismuto. L'MTA bianco presenta piccole particelle irregolari disperse e particelle oblunghe aghiformi, quello grigio mostra piccole particelle, particelle più grandi e particelle allungate (ossido di bismuto). Le fasi che costituiscono i materiali sono essenzialmente le stesse. La morfologia di superficie risente delle varie condizioni, in acqua, infatti, entrambi i tipi di MTA presentano una superficie liscia. Ancora, l'MTA grigio presenta oltre alla presenza di Al_2O_3 (+122%), MgO (+130%) e soprattutto FeO (+1000%) rispetto a quello bianco. Ossidi di zolfo, titanio e fosforo sono stati trovati in tracce, in disaccordo con Torabinejad et al (1995) (37). I due materiali differiscono oltre che per il colore, dato dalla presenza di ferro, anche per un maggiore tempo di indurimento per l'MTA bianco (77).

Le caratteristiche dell'MTA, tuttavia, dipendono non solo dai composti chimici contenuti ma anche dalla dimensione delle particelle idrofiliche, dal rapporto polvere/acqua usato per la preparazione, temperatura, presenza di acqua e di aria intrappolata.

A proposito del rapporto acqua/polvere esso influenza a diverse proporzioni le proprietà dell'MTA in termini di solubilità e porosità. Il rapporto acqua/polvere raccomandato dal produttore è 0,33. Se si valutano i residui presenti dopo la miscelazione con l'acqua si trova l'ossido di silicio, che rappresenta l'1,66%. In seguito alla sua miscelazione, l'MTA si divide in CaO e Ca₃(PO₄)₂. La soluzione acquosa ha un pH alcalino (11.94-11.99) che permette ai metalli (calcio, potassio, ferro) di presentarsi come idrossidi. L'idrossido maggiormente presente disciolto in acqua è quello di calcio. Questo dato clinicamente è sfruttabile quando l'MTA viene a contatto con i tessuti, benché solo una parte di sostanza giunga a contatto con i fluidi periapicali. Del resto le condizioni sperimentali differiscono da quelle cliniche, laddove l'MTA è utilizzato ben prima dell'indurimento. La porosità e la solubilità, come è prevedibile aumentano, all'aumentare della concentrazione dell'acqua. La porosità, inoltre, per l'MTA non è dovuta alla sola incorporazione di microscopiche bolle d'aria ma anche alla presenza di una microstruttura capillare porosa, ben osservabile al SEM. La proporzione 0.33 è realmente quella ideale secondo Fridland e Rosado (2003) rispetto a quelle minori 0.26, 0.28, 0.30 benché l'incorporazione di una maggiore quantità di acqua renda il miscuglio più liquido e meno maneggevole. I medesimi autori (41), con uno studio a lungo termine, hanno valutato la quantità di materiale solubile rilasciato dall'MTA in un mezzo acquoso e la misura del pH, a partire da rapporti acqua/polvere diversi, 0,28 e 0,33. Il periodo di studio è di circa 78 giorni. Il rapporto acqua/polvere maggiore presenta una solubilità maggiore, l'ammontare dei soluti diminuisce nel tempo, il

pH tra 11 e 12 è mantenuto per tutto il periodo di tempo dell'esperimento, dovuto al continuo rilascio di idrossido di calcio. Il valore di solubilità, però, non risulta essere pienamente attendibile, a causa dei residui fissati dalla procedura. Differenti solubilità si sono trovate confrontando l'MTA bianco, che è più solubile, all'MTA grigio e al cemento di Portland (52).

I diversi ambienti fisiologici influenzano le proprietà fisico-chimiche dell'MTA e la sua idratazione. La microstruttura dell'MTA idratato è costituita da cristalli cubici, per la maggior parte, e cristalli aghiformi. L'analisi XRD ha apprezzato un picco costituito da Portlandite, un prodotto dell'idratazione dell'MTA, essenzialmente idrossido di calcio cristallino. Se i campioni sono idratati a pH 5, non solo non mostrano i cristalli aghiformi ma presentavano delle erosioni dei cristalli cubici. Diminuiscono, inoltre, i cristalli di Portlandite e la microdurezza. Un ambiente acido, allora, è deleterio per le proprietà fisiche dell'MTA nonché per la sua idratazione. La radiopacità media dell'MTA è 7.17 mm Al. e il tempo di presa è di circa 165 min (+/-5 min), di gran lunga superiore ad amalgama 4 min (+30 s), Super-EBA, 9 min (+30 s) e IRM, 6 min (+30 s). Caratteristica, quest'ultima, positiva per la minore contrazione da polimerizzazione che rende l'MTA meno suscettibile di infiltrazione batterica e discolorimento dell'elemento dentario trattato, conferendo un'ottima capacità di sigillo. D'altro canto, l'MTA a contatto con i tessuti vitali, rende possibile una piccola o inesistente reazione infiammatoria dei tessuti periradicolari e consente la formazione di tessuto connettivo o calcificato (42). Dati questi che differiscono di poco da quelli di uno studio successivo di Islam et al (52) in cui la radiopacità del WMTA risulta essere 6.74 mm Al mentre il GMTA 6.47 mm Al. la radiopacità, è bene ricordarlo è dovuta essenzialmente all'ossido di bismuto

2.2 Proprietà meccaniche e adesive dell'MTA

La capacità di sigillo dell'MTA è data dalla sua natura idrofila e all'espansione che si ottiene in ambiente umido (15). L'MTA da solo si infila più facilmente se confrontato ad altri materiali come il One-Up Bond o il Super-EBA (43). L'adattamento marginale alle pareti dentinali migliora con la compattazione manuale piuttosto che con l'utilizzo degli ultrasuoni (46) ed è buono con o senza la rifinitura degli apici radicolari, al contrario dell'IRM ed il SuperEBA (47). Tanto l'MTA quanto il Super-EBA presentano un adattamento marginale elevato prima dell'applicazione dei carichi occlusali, che decresce in seguito all'applicazione dei carichi per entrambi i materiali (45). La resistenza alla compressione (MPa) è minore a 24 h rispetto ad amalgama, Super-EBA e IRM. Dopo 21 giorni i valori aumentano per tutti i cementi. Tuttavia, questa caratteristica non è così importante per un materiale come l'MTA che non deve essere sottoposto alle forze occlusali.

Per quanto riguarda la microinfiltrazione la letteratura raccoglie diversi articoli. Non ci sono differenze significative tra MTA e Super-EBA dopo 12 settimane usando una pressione di filtrazione di 20 psi (1406 cm H₂O) (7), mentre l'amalgama presenta una microinfiltrazione maggiore dopo 4 settimane rispetto all'MTA per una pressione 10 psi (703 cm H₂O) (48). Altri studi come quello di Wu et al. (49) hanno valutato un'incremento della microinfiltrazione per il Super-EBA (da 0% a 55%) e una diminuzione per l'MTA (da 55% a 0%) da 24 h a 3 mesi. Sulle lesioni delle forcazioni, a pressione fisiologica il Super-EBA mostra secondo Weldon et al. (50) meno microinfiltrazione dell'MTA o della combinazione dei due solo a 24h; la medesima combinazione ha più proprietà sigillanti rispetto al solo MTA, che necessita comunque di almeno 4 h per ottenere un sigillo soddisfacente. La capacità sigillante dell'MTA non è inficiata neanche da

una resezione radicolare purchè permangano almeno 3 mm di materiale. Risultati migliori si ottengono per uno spessore di 4 mm che è quello più efficace contro l'infiltrazione apicale e quindi quello più adeguato per l'uso clinico (51, 52). Lo spessore minimo di 1 mm è quello meno efficace (52). Senza ombra di dubbio è necessario valutare anche la qualità dell'infiltrato batterico contro il quale l'MTA costituisce una barriera. L'MTA, infatti, non mostra alcuna infiltrazione nei confronti dello *Staphilococcus Epidermidis* al contrario dell'IRM, dell'amalgama e del Super-EBA in uno spessore di 3 mm (6) e nei confronti dell'*Enterococcus Faecalis* se paragonato con il Super-EBA e con il Cemento all'Idrossiapatite (54).

2.3 Proprietà biologiche dell'MTA

2.3.1 Capacità antibatteriche e antimicotiche

Una delle proprietà fondamentali dei materiali endodontici, e quindi anche dell'MTA deve necessariamente essere l'attività antibatterica, che dovrebbe riguardare una vasta gamma di batteri presenti nello spazio endodontico nonché periradicolare. Da tenere in particolare considerazione soprattutto l'attività contro i microrganismi che si rendono protagonisti dell'insuccesso della terapia endodontica, come l'*E. faecalis* e la *C.albicans*. Torabinejad et al. (1995b), attraverso la diffusione in agar hanno valutato l'effetto antibatterico dell'MTA in confronto a quello dell'amalgama, del cemento ZOE e del Super-EBA su nove ceppi di batteri aerobi facoltativi: *S. fecalis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *Lactobacillus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *E. coli B* e su sette anarobi obbligati: *B. buccae*, *B. fragilis*, *P. intermedia*, *B. melaninogenica*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum* e *P. anaerobius*. L'MTA non risulta avere attività antibatterica contro *E. faecalis*, *S. aureus* and *B. subtilis* e su tutti i batteri anaerobi obbligati (13).

La pasta all'idrossido di calcio presenta una attività antimicrobica maggiore rispetto al WMTA e al Cemento di Portland nonché al Sealpex e al Dycal su *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B.subtilis* e *Candida albicans* (36). Inoltre è stato dimostrato che l'MTA come il Fill Canal (un cemento all'ossido di zinco-eugenolo) e il Sealapex (sigillante all'idrossido di calcio), è in grado di inibire la crescita di *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Il ceppo di *E. coli* non è inibito da MTA e cemento di Portland mentre il Fill Canal e il Sealapex inibiscono tutti i ceppi facoltativi analizzati (55).

L'MTA fresco e indurito è efficace, in agar, ad uno e cinque giorni nei confronti della *C. albicans*. Dopo un'ora, invece, permane la crescita del micete per entrambi i tipi di MTA (56). L' inibizione della crescita del micete, comunque, è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'MTA al di là degli intervalli analizzati che pure rivestono un ruolo importante. La concentrazione di 50 mg/ml risulta sempre efficace. Al diminuire della concentrazione diminuisce l'efficacia fino a non essere efficace affatto (57).

L' *E. faecalis* è inibito dal GMTA a tutte le concentrazioni e in tutti gli intervalli di tempo considerati al contrario del WMTA. Le differenze tra GMTA e WMTA sono da ricercarsi nella composizione chimica, soprattutto per quanto concerne l'ossido di ferro. Le conclusioni a cui sono giunti Al-Hezaimi et al., differenti da quelle degli studi precedenti, sono spiegabili, probabilmente, con la diversa composizione chimica dei materiali testati che hanno subito dei cambiamenti con la messa in commercio e a causa delle diverse metodologie utilizzate, la diluizione in provetta invece della diffusione in agar o il contatto diretto (59). Utilizzando il contatto diretto, infatti, l'MTA fresco mostra di avere un'attività sia di rallentamento della crescita che di riduzione della carica batterica contro l'*E. faecalis* solo dopo tre giorni ma non dopo un'ora ed è già attivo dopo un'ora contro *S. aureus* e *P. aeruginosa* (97).

L'MTA, sia la polvere fresca che quella del materiale già indurito, dopo 1 minuto uccide il 99% di batteri. Il materiale non indurito uccide i batteri in circa 4 h. L'aggiunta di dentina amplifica l'azione antibatterica del materiale fresco e della polvere indurita. La polvere del materiale già indurito è più efficace della polvere fresca. Il materiale indurito non frantumato esplica la sua azione in circa 4 h (60).

2.3.2 La biocompatibilità:

a) Citotossicità e genotossicità

La biocompatibilità è la capacità di un materiale di determinare un'appropriata risposta dell'ospite quando una sua specifica applicazione chimica si verifica (61).

Un qualsivoglia tessuto del paziente, allora, che entra in contatto con il suddetto materiale, non dovrà soffrire di alcuna azione tossica, irritante, infiammatoria, allergica, genotossica o carcinogena (62, 63).

I materiali endodontici sono stati sottoposti a test intensivi sia *in vitro* che *in vivo*.

Le sperimentazioni *in vivo* permettono di analizzare le interazioni tra il materiale sotto esame ed il tessuto. Le sperimentazioni *in vitro*, come le colture cellulari, permettono il controllo di fattori sperimentali di difficile applicazione nei test *in vivo*.

Per citotossicità si intende la capacità di un materiale di indurre nella cellula la morte, per apoptosi o mediante la necrosi; la genotossicità è la capacità di un materiale di indurre modifiche al DNA che possono perpetuarsi nelle cellule figlie.

I primi studi sulla citotossicità dell'MTA hanno rivelato, fin da subito, la scarsa citotossicità su fibroblasti di topo immortalizzati, sia del materiale fresco rispetto a Super-EBA e IRM che di quello indurito (16). Sui fibroblasti di topo i materiali freschi determinano denaturazione proteica e lisi cellulare mentre i materiali induriti sembrano non avere effetti lesivi sulle cellule (81). L'MTA, inoltre, come del resto l'IRM e il SuperEBA, non è mutagenico al test di Ames (64).

Sui fibroblasti umani l'MTA riduce di poco la proliferazione e non ha effetto sulla deidrogenasi mitocondriale (12). Su queste ultime cellule un altro studio riferisce che l'MTA è meno tossico di Super-EBA e amalgama appena miscelato, sia a concentrazioni basse che elevate mentre il cemento già indurito diminuisce la sua

tossicità rispetto al materiale fresco solo ad alte concentrazioni ma è comunque meno tossico del Super-EBA (17). Se il materiale è posto in cavità a livello dell'apice di denti umani estratti, a contatto con il materiale fresco a 4, 8, 24 h le cellule appaiono al SEM sofferenti con vacuoli e bolle e non legate al substrato mentre a contatto col materiale indurito dopo 24 h ci sono cellule rotonde, lisce ben aderenti all'MTA con lamellipodi e filopodi (63).

Su fibroblasti parodontali umani dopo 24, 48, 72h di incubazione con WMTA non è evidenziata una citotossicità significativa rispetto al controllo, al saggio all'MTT e al Trypan blu. Il WMTA risulta essere meno citotossico del CYMED 8410, dell'Endion e del Diaket.

L'MTA è meno tossico per le cellule U2OS anche rispetto all'idrossido di calcio (86). La tossicità del materiale fresco è dovuta al rilascio dei minerali presenti nella polvere, soprattutto del calcio (63, 86).

La citotossicità dell'MTA ProRoot, dell'MTA-Angelus e del cemento di Portland su cellule endoteliali umane, valutata con MTT test è sovrapponibile ed è caratterizzata da una prima fase di maggiore citotossicità a 24 h e da una diminuzione della stessa a 48 e 72 h (64).

Tanto l'MTA quanto il cemento di Portland, inoltre, non risultano essere citotossici al test al trypan blu né genotossici al Comet test alcalino su cellule di linfoma di topo e su cellule ovariche di criceto. Nello specifico non risultano danni primari al DNA, né incremento della mortalità cellulare (65-67).

All'XTT MTA-Angelus bianco e ProRootMTA bianco non mostrano differenze statisticamente significative circa la citotossicità su fibroblasti pulpari di topo e fibroblasti umani. La vitalità è maggiore per i fibroblasti umani che per le cellule pulpari di topo, per tutti i materiali analizzati e per entrambe le valutazioni (24 e 72 h) (70). L'MTA non risulta neanche incrementare le specie reattive dell'ossigeno

oltre a non essere citotossico e genotossico, come riferiscono Camargo et al., confrontando l'MTA grigio e bianco con un nuovo cemento, il COB, l'Hydro C e il Vitrebond, a diverse diluizioni (71).

b) Proliferazione, espressione genica, produzione dei mediatori, induzione

Oltre alla citotossicità e alla genotossicità, nel corso degli anni molti studi si sono occupati della variazione nella espressione di prodotti cellulari che può scaturire dal contatto con l'MTA. Su tutti i fattori implicati, spicca il rilascio delle citochine, prodotte da macrofagi e osteoblasti e che sono un buon marker per testare il metabolismo osseo.

In vivo la risposta tissutale all'MTA, fin dai primi studi, è stata migliore di quella degli altri materiali testati e si assiste alla formazione di tessuto duro neoformato dopo una settimana (10).

Koh et al.(1997) hanno esaminato colture di MG63, cellule di osteosarcoma umano, a contatto con l'MTA indurito in ambiente umido, il rilascio di citochine, osteocalcina (OCN) e l'attività della fosfatasi alcalina di queste colture. L'attenzione è stata posta sull' M-CSF, l'IL-1 α , IL-1 β , IL-6, citochine che modulano il *recruitment* e l'attività osteoclastica/osteoblastica e sull'osteocalcina, proteina la cui presenza sottolinea l'attività osteoblastica. Le interleuchine 1 mediano le interazioni tra osteoblasti e osteoclasti e mediano la sintesi dell'IL-6, necessaria per il riassorbimento osseo. L'IL-1 β , poi, a basse concentrazioni, stimola la proliferazione cellulare. La valutazione della fosfatasi alcalina, fondamentale per la funzione osteoblastica, ha essenzialmente lo scopo di valutare le modifiche alla differenziazione. La morfologia delle cellule a contatto con l'MTA è fibroblasto-simile con prolungamenti citoplasmatici che si estendono nel materiale stesso. Le

cellule infatti si attaccano al proprio substrato e tendono a crescere in prossimità della struttura amorfa, dove sono presenti soprattutto i fosfati. Laddove, invece, è presente l'ossido di calcio si valutano poche cellule. Al SEM sono visibili cellule in salute a contatto con l'MTA. Per quanto riguarda i prodotti cellulari, è statisticamente significativo l'aumento delle interleuchine, che non sono prodotte dalle cellule controllo e dell'osteocalcina. Trascurabili le differenze, rispetto al controllo, del livello di fosfatasi alcalina e M-CSF. Inoltre, nel medesimo studio, si è visto che somministrando un inibitore della tirosina-chinasi, l'erbimicina, si inibisce il rilascio di prodotti cellulari, facendo pensare ad una dipendenza dell'attivazione cellulare da una tirosina-chinasi (70).

Sulle medesime cellule a 2, 4, 7 giorni, uno studio di Mitchell et al.(1999) ha valutato una buona crescita cellulare e un incremento sia dell'IL-6, in accordo con gli studi precedenti, che dell' IL-8, un potente chemiotattico per le cellule dell'infiammazione che stimola i precursori osteoclastici, l'angiogenesi e stimola il turnover osseo. Non si evidenzia neanche l'espressione del M-CSF, dell'IL-1 α e dell'IL-11, importante per la differenziazione dei precursori emopoietici. La mancanza di espressione di IL-1 α può essere dovuta alle diverse concentrazioni di materiale testato rispetto allo studio di Koh et al. (1997) oppure, e non è da escludersi, al fatto che l'IL-1 α è anche implicata nella disgiunzione dei processi di riassorbimento da quelli di neoapposizione. Per queste ragioni, un materiale biocompatibile come l'MTA potrebbe non stimolarne l'espressione. Secondo questi studiosi, l'MTA stimola l'attività osteoblastica o a causa di piccole quote di materiale che solubilizzato stimolava le cellule ad esprimere le citochine o la medesima microstruttura cristallina poteva fungere da stimolo per l'adesione, la crescita, l'espressione dei mediatori (71). Le stesse cellule di osteosarcoma umano MG-63 si legano al substrato per un tempo doppio rispetto agli osteoblasti primari,

e mostrano maggiore affinità, intanto, per il WMTA rispetto al GMTA, a causa della differente porosità superficiale che incentiva il legame ma comunque non sopravvivono dopo 13 giorni. Le cellule primarie formano dei noduli calcificati quando a contatto con il mezzo per la differenziazione, cosa che non accade con le MG-63 (89).

Sui fibroblasti gengivali, invece, sono stati valutati il rilascio di PGE₂, con o senza stimolazione dell'acido arachidonico, la sintesi proteica e la proliferazione. Le prostaglandine ricoprono un ruolo non solo nei processi infiammatori ma anche nella rigenerazione tissutale, nella proliferazione e nella crescita. La concentrazione di PGE₂ è notevolmente aumentata per le cellule trattate con MTA mentre la sintesi proteica è diminuita ma non in maniera tanto significativa da essere considerata come un sintomo di processo infiammatorio in atto. La proliferazione è ai livelli del controllo mentre non c'è incremento della sintesi di lattato, dato che sottolinea la scarsa attività flogogena dell'MTA (73).

L'MTA risulta essere cemento conduttivo per cementoblasti immortalizzati. Già dopo 24 h di incubazione le cellule mostrano di legarsi alla superficie di MTA e crescere, presentando numerose estensioni citoplasmatiche che si proiettano verso le cellule limitrofe. L'immagine cellulare induce a pensare a cellule in salute capaci di esprimere i geni predisposti e formare una matrice extracellulare adeguata. L'osteocalcina è prodotta dai cementoblasti da 2 a 7 giorni. Sono risultate essere espressi il gene GAPDH, che è costitutivo delle cellule di mammifero e che non risulta essere dipendente dall'esposizione all'MTA, il collagene di tipo 1, indispensabile componente della matrice extracellulare prima della formazione della matrice mineralizzata che promuove nel cemento l'integrità della quota di tessuti duri e molli, il legame cellulare, lo sviluppo, la sua maturazione e la sua riparazione. La fosfatasi alcalina e l'OCN sono strettamente legati alla

mineralizzazione e sono entrambi espresse a 3 e a 5 giorni (83). Hakki et al (2009) confermano i dati emersi precedentemente sottolineando un'attività di induzione della mineralizzazione e favorente l'espressione dei geni delle sialoproteine ossee (BSP), del collagene di tipo I (COL I), dell'osteocalcina (OCN), dell'osteopontina (OPN), geni implicati in essa. Per valutare la mineralizzazione è stata utilizzata la colorazione di Von Kossa e la RT-PCR a 3 e 5 giorni, per valutare l'espressione genica. La concentrazione 20mg/mL è tossica per le cellule mentre le concentrazioni più basse mostrano una vitalità cellulare superiore a quella del controllo a 24 h. A 72 h, le concentrazioni 0,02 e 0,002 mg/mL inducono un aumento considerevole della sopravvivenza rispetto alle altre concentrazioni. La mineralizzazione e l'espressione di BSP e OPN-mRNA a 5 giorni per le concentrazioni di 0,02 e 0,002 mg/mL è aumentata mentre COL I-mRna aumenta a partire dal 3 giorno per le concentrazioni comprese tra 0,1 e 0,002 mg/mL mentre a 5 giorni aumenta solo per le due concentrazioni più basse. Per quanto riguarda l'osteocalcina si registra una diminuzione leggera per le cellule trattate con l'MTA a 5 giorni (99). I cementoblasti, inoltre, risultano proliferare meglio su di una superficie di WMTA che sul GMTA anche se entrambi i prodotti sono biocompatibili tanto da contribuire alla rigenerazione dei tessuti dopo una perforazione radicolare (98)

Grossa rilevanza assume lo studio di Huang et al. (2003), sugli effetti dell'MTA sulle cellule U2OS, cellule di osteosarcoma umano. In particolare l'attenzione si è posta su ERKs-1 e -2, proteine MAPK, chinasi implicate nella proliferazione, differenziazione e apoptosi delle cellule ossee. Il saggio all'MTT è stato utilizzato per stimare l'attività mitocondriale mentre per valutare la presenza delle proteine ERK si è ricorsi al Western blot. Con dei test dose e tempo dipendente si è giunti alla conclusione che le cellule riescano a sopravvivere in presenza di MTA,

maggiormente rispetto al controllo, ma soprattutto che l'attività delle proteine ERKs è dose-dipendente rispetto alla concentrazione dell'MTA, e diminuisce all'aumentare del tempo, essendo anche tempo-dipendente. Le proteine ERKs allora svolgono un ruolo determinante nella trasduzione del segnale di proliferazione e il loro pathway è quello chiamato in causa dall'azione dell'MTA (85).

Confrontando il ProRoot-MTA e l'MTA-Angelus si è osservato che entrambi non interferiscono sulla produzione di citochine come l'IL-12 e IL-10 e del TNF né da soli né in associazione con batteri Gram+ o Gram- o INF γ sui macrofagi M1 e M2. L'Angelus, però, dopo 24 h di esposizione, stimola maggiormente i macrofagi M2. Gli stessi M2 in presenza di *F. nucleatum* producono alte concentrazioni di IL-10 (81) Dati questi, in disaccordo con gli studi precedenti di Haglund et al. (2003) che riferiscono come l'MTA impedisca la crescita cellulare dei fibroblasti e dei macrofagi di topo e determini denaturazione proteica e lisi cellulare non aumentando affatto la produzione di citochine (72).

Usando cellule simil-odontoblastiche di topo (MDPC-23) e cellule pulpari indifferenziate (OD-21) è stato analizzato l'effetto che l'MTA esplica sull'apoptosi cellulare e sul ciclo cellulare. Le cellule sono state sottoposte a diverse concentrazioni di cemento per 24 h. Con la citometria a flusso si è evinto che il materiale non induce l'apoptosi delle cellule pulpari anzi esso induce un modesto incremento nella percentuale delle cellule (MDPC-23) nelle fasi S e G₂ del ciclo cellulare, mentre le cellule OD-21 hanno mostrato un modesto incremento nella fase S del ciclo cellulare che potrebbe spiegare il successo dell'MTA come materiale da incappucciamento (75).

Le cellule ossee marroni di topo al SEM e al TEM appaiono ben legate al substrato e in buona salute. Non ci sono variazioni dei livelli di ALP rispetto al

controllo. L'espressione del collagene di tipo I- mRNA è più basso, mentre l'mRNA che codifica per l'osteopontina è più alto. La proliferazione è buona ma è minore rispetto al controllo. Le cellule appaiono allungate e schiacciate facendo presupporre una capacità dell'MTA di sopprimere la funzione osteoblastica nelle cellule a favore di una fibroblastica in vitro (90).

I fibroblasti pulpari umani sono stimolati dall'MTA a proliferare dopo 12 giorni rispetto al Dycal, cemento a base di idrossido di calcio. Anche il rilascio di calcio è maggiore in presenza di MTA, in tutti gli intervalli di tempo analizzati, ed è pari a 3mmol/L. Dato significativo, se le cellule sono coltivate in presenza di calcio esogeno, aggiunto al mezzo di coltura, esse proliferano in maniera dose dipendente e come in presenza dell'MTA se si aggiungono 0,3 mmol/L(106)

L'MTA non risulta tossico su fibroblasti pulpari di topo, ma anzi stimola la mineralizzazione nel 60% dei casi, regolando, tra l'altro, l'espressione dell'mRNA della proteina BMP-2, con un aumento del 40%, a fronte di una diminuzione indotta dal Dycal (108).

L'espressione di Runx2, direttamente implicata nei processi di guarigione negli osteoblasti alveolari umani e il collagene di tipo I sono stati oggetto di studio da parte di Perinpanayagam e Al-Rabeah (2009) che hanno sottolineato che le cellule si attaccano al substrato in 24h e presentano numerosi processi cellulari che sono in contatto con l'MTA e le altre cellule. Dopo una settimana è già presente una matrice di collagene e uno strato consistente entro due settimane. L'espressione di Runx2, esaminata con la RT-PCR aumenta dopo 1 e dopo 2 settimane, essendo scarsa nelle prime 24 h. Anche il collagene tende ad aumentare. L'espressione genica non è inficiata dalle diverse formulazioni dell'MTA, nella versione grigia, bianca e infine con l'aggiunta di acqua o soluzione anestetica (110).

c) Reazioni tissutali, induzione di una barriera calcificata.

Torabinejad et al (1995) hanno valutato la reazione tissutale all'MTA e al Super-EBA su mandibola di porcellini d'india analizzando cinque campioni per materiale. L'attenzione è stata posta soprattutto sulla presenza di infiammazione, sul tipo di cellule predominanti e sulle caratteristiche del connettivo nelle vicinanze dell'impianto. Raramente l'MTA induce reazioni infiammatorie, con la formazione in un campione su cinque anche di tessuto osseo piuttosto che fibroso, sempre presente a contatto con il Super-EBA. Il connettivo nelle vicinanze del Super-EBA risulta più duro. L'infiammazione è assente in tre campioni su cinque a contatto con l'MTA ed è sempre presente per il Super-EBA con predominanza di macrofagi (110). Risultati analoghi e ancora più incoraggianti hanno ottenuto Saidon et al. (2003), che sui medesimi animalotti hanno analizzato la reazione tissutale in vivo data da impianti con MTA e PC. A 2 settimane nessun impianto aveva indotto una reazione infiammatoria. Gli impianti con l'MTA avevano manifestato una neoapposizione a diretto contatto col materiale, per la maggior parte, e in minor misura una neoapposizione ossea con interposizione di connettivo fibroso a contatto col materiale. A 12 settimane, i risultati erano praticamente sovrapponibili ma, benché non ci fosse un'infiammazione cronica in atto, due degli impianti mostravano un accumulo di macrofagi (81). Souza et al., l'anno dopo, utilizzando gli stessi animali hanno studiato l'impianto in regione periapicale dell'MTA a 4 e 12 settimane. Nel primo periodo l'infiammazione è nulla o molto lieve e l'osso sano riesce a formarsi a contatto col materiale. A 12 settimane non si stima reazione infiammatoria se non a contatto con il carrier di Teflon usato, mentre è visibile nuovo tessuto osseo e odontoblasti a contatto col materiale (82).

Se l'MTA è impiantato nel tessuto sottocutaneo di topi in un primo momento, a 15 giorni, determina una forte reazione infiammatoria con necrosi coagulativa e calcificazioni distrofiche, reazione che però a 30 e 60 giorni diminuisce alquanto. Non si osservava osteogenesi né per l'MTA né per il Super-EBA, segno che i materiali non sono osteoinduttivi. La reazione intraossea è, invece, meno marcata ed inoltre si palesa una capacità di indurre osteogenesi, che rende entrambi i materiali osteoconduttivi (76). La reazione del tessuto connettivo di topi albini Wistar all'impianto sottocutaneo di MTA e amalgama ha dimostrato che i materiali sono ben tollerati. Negli intervalli di tempo esaminati da Yaltirik et al. (2004), per l'MTA, si sono viste una necrosi coagulativa e una calcificazione distrofica, a 7 e 15 giorni, con un moderato infiltrato infiammatorio di macrofagi e cellule giganti che aumenta a 30 giorni, in presenza di una capsula fibrosa e di calcificazione distrofica. Successivamente, a 60 e 90 giorni permane la calcificazione distrofica e diminuisce l'infiltrato infiammatorio fino a scomparire (104).

Inducendo delle perforazioni su radici di denti di cane, dopo averne preparato e otturato i canali radicolari si valuta da un punto di vista istologico che non si manifesta, in genere, a 30 giorni infiammazione del legamento parodontale ma anzi deposizione di cemento nelle vicinanze dell'MTA. In qualche caso possono essere presenti piccole aree di anchilosi e cellule dell'infiammazione cronica. Dopo 180 giorni è maggiormente presente il cemento a scapito dell'infiammazione, che scompare. Il cemento neoformato è cellulare ed eosinofilo e qualche volta forma uno strato irregolare. Altre volte, poi, la calcificazione è imperfetta e permane materiale connettivo tra quello calcificato. Qualche caso presenta infiammazione cronica e infiltrato gigantocellulare. Non si repertano segni di anchilosi (77). Del resto, l'idrossido di calcio, che si forma a partire dall'ossido di calcio presente nell'MTA reagendo con i fluidi tissutali, a contatto con i tessuti pulpari induce

deposizione nel mezzo di coltura di cristalli di calcio. Questi cristalli a stretto contatto con la fibronectina possono essere il primo gradino verso la formazione di una barriera calcificata (92-94).

I tessuti periradicolari di cani Beagle a contatto dell'MTA mostrano già dagli studi condotti da Torabinejad et al. (1995) una minore infiammazione rispetto all'amalgama già a 2 e 5 settimane dall'intervento, che diventa significativa a 10 e 18 settimane. Le cellule predominanti a contatto con l'MTA sono i linfociti, quando presenti, anche nelle fasi iniziali allorquando a contatto con l'amalgama prevalgono i PMN e qualche cellula gigante. A contatto con l'MTA è quasi sempre reperibile una capsula fibrosa e nelle osservazioni a 10 e 18 settimane anche la formazione di cemento che non è presente nei campioni trattati con amalgama (10). Questi dati sono sostanzialmente confermati da Baek et al (2005) che sottolineano l'attività meno flogogena dell'MTA rispetto ad amalgama e Super-EBA e la presenza di un infiltrato ricco in linfociti ma non di PMN. A contatto con l'MTA è presente del tessuto calcificato cemento-simile, a volte una struttura cristallina a volte cemento neoapposto che inizia nelle vicinanze della dentina, o ad isolotti, per poi apparire in ultima istanza come cemento cellulare mineralizzato. Unica differenza rispetto allo studio precedente, la mancanza di una capsula fibrosa a contatto con l'MTA. Risultati analoghi avevano riportato Torabinejad et al. (1997) su tessuti periradicolari di scimmia (102).

Sempre su cani Beagle i denti immaturi trattati con MTA mostrano una barriera calcificata di maggiore consistenza rispetto a quella indotta dall'idrossido di calcio e dalla proteina osteogenica OP-1 ma quantitativamente uguale. Anche l'infiammazione provocata è pressoché simile nei materiali testati (14).

Economides et al.(2003), in accordo con gli studi precedenti, ha analizzato l'MTA a contatto con i tessuti periapicali, valutandone la bontà come materiale da

otturazione retrograda dopo apicectomia in denti di cani meticci. Nell'immediato postoperatorio è presente tessuto connettivo che cede il posto poi ai tessuti duri, progressivamente dalla periferia esterna della radice lungo l'interfaccia MTA-tessuti molli. Tanto il sottile strato di tessuto duro quanto il tessuto connettivo, sono a stretto contatto con l'MTA. Ad 1 settimana dall'intervento le cellule presenti in vicinanza del materiale sono di forma allungata e basofile o poligonale con poco collagene e grossi nuclei; dopo 2 settimane prevalgono di gran lunga i fibroblasti e le fibre collagene che si pongono parallelamente e che dopo un periodo di 3-5 settimane avvolgono la radice trattata come un manicotto di tessuto. Il tessuto duro invece è presente fin dalle due settimane dopo l'intervento prima maggiormente sulla superficie dentinale esposta e tracce si repertano all'interfaccia tra connettivo e MTA. La banderella di tessuto duro è ben organizzata, omogenea con depositi di cristallo ben organizzati. La reazione infiammatoria è presente nei diversi momenti di osservazione ma raggiunge picchi di severità solo in alcuni campioni a 3 settimane. Le cellule dell'infiammazione sono soprattutto linfociti e macrofagi. L'osso guarisce e si vede una neoapposizione dopo circa 2-5 settimane dall'apicectomia (91)

Matt et al.(2004) hanno confrontato la capacità di indurre la formazione di una barriera calcificata da parte del GMTA e WMTA. Gli autori hanno utilizzato porzioni di radici di incisivi umani per simulare l'apice beante, due diversi spessori di materiale (2 e 5mm) e due tecniche (one step con otturazione immediata o two step). Il GMTA ha mostrato minore infiltrazione mentre la tecnica in due tempi, con MTA già indurito a 24 h e lo spessore di 5 mm sembrano dare maggiore garanzia di successo (105).

In vivo su denti trattati che presentano lesioni periapicali, l'attività dell'MTA è sovrapponibile a quella dell'IRM come materiale da otturazione retrograda e non

c'è quindi una differenza statisticamente significativa (54). Per quanto riguarda la capacità dell'MTA di favorire il completamento della radice Felipe et al. (2006) hanno condotto uno studio su premolari di cane con apice immaturo. Lo scopo era inoltre testare la necessità di aggiungere all'MTA l'idrossido di calcio. I fattori analizzati per valutare il successo erano molteplici: presenza di infiammazione, formazione di una barriera calcificata, livello della barriera, riassorbimento radicolare e osseo, estrusione dell'MTA, presenza di microrganismi. Un gruppo di denti riceve allora solo l'MTA (gruppo I), un altro MTA+idrossido di calcio (gruppo II). Entrambi i gruppi mostrano la presenza di una barriera calcificata apicale che per il gruppo I è interna al canale, per il gruppo II oltre il limite delle pareti dentinali. L'infiammazione cronica è presente in ambo i gruppi in percentuali basse come il riassorbimento osseo e radicolare, che non mostrano differenze significative. L'MTA risulta estrudere di più nel secondo gruppo. Da questi dati si evince che l'utilizzo combinato risulta essere non utile se non addirittura deleterio (94).

In uno studio retrospettivo, invece, sono stati trattati dei denti necrotici ad apice immaturo, con lesione apicale, di giovani pazienti, per una procedura breve (3 mesi) o lunga (3 mesi). I denti del primo gruppo sono stati otturati con guttaperca compattata contro una barriera artificiale di MTA mentre quelli del secondo presentavano una barriera indotta dall'idrossido di calcio verso la quale era compattato l'MTA, l'amalgama o la guttaperca. Le lesioni periapicali scompaiono in un lasso temporale che va dai 3 ai 21 mesi dopo la terapia. Le terapie sono entrambe valide e i segni di un iniziale accrescimento radicolare si vedono già a circa due mesi mentre il completamento è valutabile già verso il decimo mese (95). Ovviamente è bene ricordare la grossa capacità rigenerativa di elementi dentari in

soggetti così giovani e le possibilità di reazione infiammatoria che allontanano la noxa patogena in elementi ad apice beante.

Contemporaneo di questo studio quello di Tawil et al. (2009) per valutare la guarigione periapicale usando tre differenti materiali: MTA, IRM, Geristore (composito ionomero ibrido); dopo microchirurgia, utilizzando cani beagle. I denti trattati e infettati appositamente venivano trattati dopo 30 giorni. L'apice viene rimosso in questo momento, l'infezione non viene eradicata e viene posto il materiale da testare con l'ausilio del microscopio chirurgico. Dopo 6 mesi da un punto di vista istologico non c'è differenza tra MTA e IRM (e già lo so) mentre il Geristore presenta una guarigione minima (111).

Hashem e Hassanien (2008) hanno confrontato l'abilità dell'MTA Angelus, dell'IRM e del ProRoot-MTA nel riparare una perforazione alla forcazione indotta sperimentalmente. I denti usati erano molari inferiori umani e la metodologia era quella di valutare allo spettrofotometro l'infiltrazione del colorante a livello della lesione. Il ProRoot MTA, sia da solo che con l'utilizzo di una matrice interna di collagene e l'MTA-Angelus con la matrice interna risultavano infiltrarsi di meno (107).

A contatto con l'MTA il tessuto pulpare, dopo esposizione, presenta una struttura normale senza segni di infiammazione e degenerazione tissutale nel post operatorio, mentre a due e tre settimane è presente emorragia centralmente al tessuto. Le cellule pulpari, in prima settimana, al TEM mostrano cambiamenti funzionali e di forma, si presentano allungate, con un aumentato rapporto citoplasma/nucleo, nucleo eccentrico e citoplasma ricco in mitocondri, reticolo endoplasmatico rugoso e ribosomi liberi. Si assiste, inoltre, alla formazione di una struttura omogenea cristallina a contatto con i processi citoplasmatici. La microanalisi ai raggi X mostra picchi che corrispondono al calcio e al fosforo. In seconda settimana è

presente una matrice osteotipica irregolare ed una barriera di osteodentina atubulare. Le cellule si presentano in salute e in attività. A tre settimane è completa la barriera di tessuto duro che nel sito di esposizione mostra al SEM la struttura superficiale tipica della dentina da riparazione (103).

L'MTA può, secondo Dominguez et al. (2003), essere considerato migliore rispetto all'idrossido di calcio nel mantenere la vitalità pulpare nell'incappucciamento diretto. Istologicamente la reazione pulpare è di una minima infiammazione per il 90% e di necrosi per il 10% a fronte del 50% di necrosi per l'idrossido di calcio. L'MTA provoca la formazione di scaglie di dentina, di solito, e più raramente la formazione di un ponte dentinale completo. Anche in caso di pulpotomia l'MTA è meno flogogeno. Utilizzando il DSP (Dentin Sialoprotein) come marker dell'attività odontoblastica, Andelin et al. hanno visto come la formazione di tessuto duro data dall'MTA presenta molte somiglianze con la dentina normale (88).

La risposta all'MTA bianco e grigio della polpa di denti di cane, mostra una barriera calcificata, in prossimità della quale sono situate cellule simil odontoblastiche, per entrambi i materiali già dopo una settimana. Non c'è necrosi ma c'è un lieve infiltrato infiammatorio sotto lo strato odontoblasto-simile. A due settimane il tessuto è più spesso e l'infiammazione minore. Lo spessore del tessuto è, come già ad una settimana, maggiore in periferia. Ci sono, inoltre, aree di riassorbimento e neoapposizione di dentina addossate alla zona di esposizione. Non mancano piccole calcificazioni all'interno della polpa. Non ci sono differenze significative tra i due tipi di MTA (92).

Tra MTA-Angelus e ProRoot non sussistono differenze significative circa l'infiammazione, la formazione di una barriera calcificata, quando usati per l'incappucciamento in denti liberi da esposizione batterica. Da un punto di vista

istologico sia a 30 che a 60 giorni l'Angelus mostra una barriera calcificata che aumenta di spessore col passare del tempo. C'è una piccola quota di elementi dentari in cui un'infiltrato infiammatorio cronico è riscontrabile ma senza infiltrato batterico. Il ProRoot a 30 giorni mostra dati sovrapponibili benché ci siano casi di infiltrato infiammatorio acuto, con reazioni di diversa intensità ma senza le cellule giganti presenti a contatto dell'Angelus. Dopo 60 giorni lo spessore della barriera calcificata aumenta, è presente in alcuni casi una reazione infiammatoria cronica (93). Anche per Nair et al. (2008) la polpa umana esposta iatrogenamente all'MTA mostra ad una settimana dall'intervento chirurgico, in genere, assenza di infiammazione e necrosi, tranne un caso di iperemia e la presenza di una capsula fibrosa. La presenza di tessuto calcificato a contatto con la polpa è valutabile già ad un mese mentre al TEM si repertano processi citoplasmatici a contatto con il tessuto calcificato. Dopo tre mesi, invece, solo un campione presenta una barriera calcificata interrotta da un gap dove sono presenti cellule infiammatorie. Al TEM si osservano strutture tubulari sul fronte della polpa che presenta cellule attive e cuboidali (109)

2.4 Le cellule staminali

Si definisce staminale una cellula non differenziata che mostra di possedere:

- capacità di auto-rinnovamento andando incontro a divisioni cellulari simmetriche;
- capacità differenziativa perché in grado di generare uno o più tipi cellulari differenziati tanto *in vivo* quanto *in vitro*;
- capacità di divisione cellulare asimmetrica, perché genera una cellula figlia che conserva le caratteristiche del progenitore e un'altra che si differenzia per dar vita ad una particolare tipologia cellulare.

Le cellule staminali sono definite “clonogeniche” perché possono proliferare formando una progenie cellulare anche se non tutte con lo stesso potenziale differenziativo e sono definite “plastiche” perché abili nel produrre tessuti eterogenei (109).

Le cellule staminali sono classificate in base alla tipologia in: totipotenti, pluripotenti, multipotenti fetali e multipotenti adulte (tabella I) e in base alla loro origine (tabella II) (108).

Tabella I e Tabella II(*Di Caprio et al. 2009*)

Tipologia di cellula staminale	Origine	Capacità
Totipotente	Uovo fertilizzato	Differenziare in tutti i fenotipi cellulari dell'embrione e dell'individuo adulto. Ogni cellula può dar vita ad un nuovo individuo.
Pluripotente	Massa cellulare interna alla blastocisti (cellula staminale embrionale).	Formare tutte gli stipiti cellulari dell'organismo, incluse le cellule germinali e le cellule extraembrionali.
Multipotente Fetale	I tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma)	Generare più stipiti cellulari che costituiscono tessuti diversi di un organo.

Cellule Staminali	Donatore	Vantaggi	Svantaggi
Autologhe	Lo stesso individuo accettore.	Minori problemi di rigetto immunologico e trasmissione di agenti patogeni.	In alcuni casi possono non essere disponibili cellule donatrici, come in pazienti molto malati o anziani.
Allogeneiche	Un individuo che appartiene alla stessa specie del soggetto accettore.	Riduzione del tempo di attesa per la completa sostituzione dei tessuti. Opportunità di usufruire di cellule sane.	Rischio di rigetto immunologico e trasmissione di agenti patogeni. Limitazioni etiche e legali concernenti l'uso di materiale cellulare umano.
Xenogeneiche	Un individuo di specie diversa dal soggetto accettore.	Minori problematiche legali ed etiche associate al prelievo delle cellule.	Alto potenziale di rigetto immunitario e trasmissione di agenti patogeni dall'animale donatore al soggetto ricevente.

A causa della diversa plasticità si distinguono le cellule staminali embrionali dalle cellule staminali adulte (o post-natali). Le cellule staminali post-natali autologhe possono essere raccolte dal midollo osseo (101), dal sangue periferico (102), dal grasso rimosso con la liposuzione (103), dalla mucosa orale, dalla pelle, dal sangue del cordone ombelicale (104), dal legamento parodontale (105), dalla polpa dentaria.

2.4.1 Cellule staminali mesenchimali

Già negli anni 60' Friedenstein e colleghi isolarono e identificarono una popolazione di cellule dal midollo osseo postnatale che aveva la capacità di generare osso, cartilagine, cellule adipose del midollo e lo stroma che supporta la formazione del sangue (106). Per le loro multipotenzialità e la sede da dove erano state prelevate furono chiamate “bone marrow stromal stem cells” (BMSCs) (107). Successivamente, Caplan et aln(107) coniarono il termine di “cellule staminali mesenchimali”.

Numerosi studi, inoltre, hanno sottolineato come cellule staminali sono state trovate in altri tessuti connettivi (108, 109) sebbene non se ne conoscano appieno le similarità con quelle del midollo osseo. Per l'origine e per la capacità di ricreare cellule associate ai tessuti dell'osso esse sono state anche definite “skeletal stem cells” (SSCs) (110,111). La loro esistenza in tessuti diversi dal midollo è ampiamente documentata, come la capacità di generare cartilagine, la plasticità e la multi potenzialità (123-125). Da queste cellule è possibile la differenziazione in cellule muscolari, nervose, in cardiomiociti.

2.4.2 Cellule staminali della polpa e degli altri tessuti dentari

Cellule staminali mesenchimali sono state rinvenute in tessuti dentari come la polpa dentaria adulta (cellule staminali della polpa dentaria, DPSC), la polpa dentaria di denti decidui esfoliati (cellule staminali da denti umani decidui esfoliati, SHED), il legamento parodontale adulto (cellule staminali del legamento parodontale, PDLSC), ed il follicolo dentario (cellule staminali del follicolo dentario, DFSC) (103, 126, 127).

Le cellule staminali pulpari umane (DPSC) hanno la capacità, in vitro, di auto-rinnovarsi e di differenziare in diversi stipiti cellulari, in odontoblasti e di mineralizzare (128); in particolare sono capaci di rispondere a specifici segnali ambientali e di generare nuove cellule staminali, o selezionare un particolare programma differenziativo (129). La caratteristica più evidente delle DPSC è che possono rigenerare un complesso pulpo-dentinale simile a quello degli elementi dentari umani naturali. Gronthos e colleghi hanno mostrato che esse possono in un mezzo di coltura fortemente adipogenico generare adipociti (128). Probabilmente differenti fenotipi cellulari risiedono nella polpa e sono altamente proliferativi e auto-rinnovanti, capaci di generare cellule progenitrici più differenziate.

Cellule staminali della polpa dentaria sono state ottenute anche da denti decidui umani esfoliati (SHED) (128). Esse mostrano maggiori velocità di proliferazione, un ciclo cellulare più rapido rispetto alle DPSC. Le SHED sono capaci di differenziare in pre-odontoblasti e depositare una matrice extracellulare che diventa un tessuto osseo calcificato e a formare strutture simil-dentinali (129,130). Inoltre, è stato riscontrato che le SHED sono in grado di differenziare in altri fenotipi cellulari, come adipociti e miociti, a conferma della loro multipotenzialità (130).

Anche il parodonto possiede capacità rigenerative. Il processo di rigenerazione parodontale richiede nel coinvolgimento di precursori cellulari indifferenziati di derivazione locale. Tale popolazione staminale (PDLSC) multi potente (132) ha la capacità di differenziarsi sia in cellule che producono il legamento parodontale che in cementoblasti che producono tessuto mineralizzato, o in cellule che formano osso (133-135).

Delle cellule staminali sono state isolate anche dal follicolo dentario (DFSC). Esso è stato a lungo considerato un tessuto multipotente a causa della sua abilità nel generare cemento, osso e legamento parodontale (136). Le cellule staminali dal follicolo dentario sono ritenute capaci di differenziare producendo strutture simili al legamento parodontale, all'osso ed al cemento (137). (Fig.1)

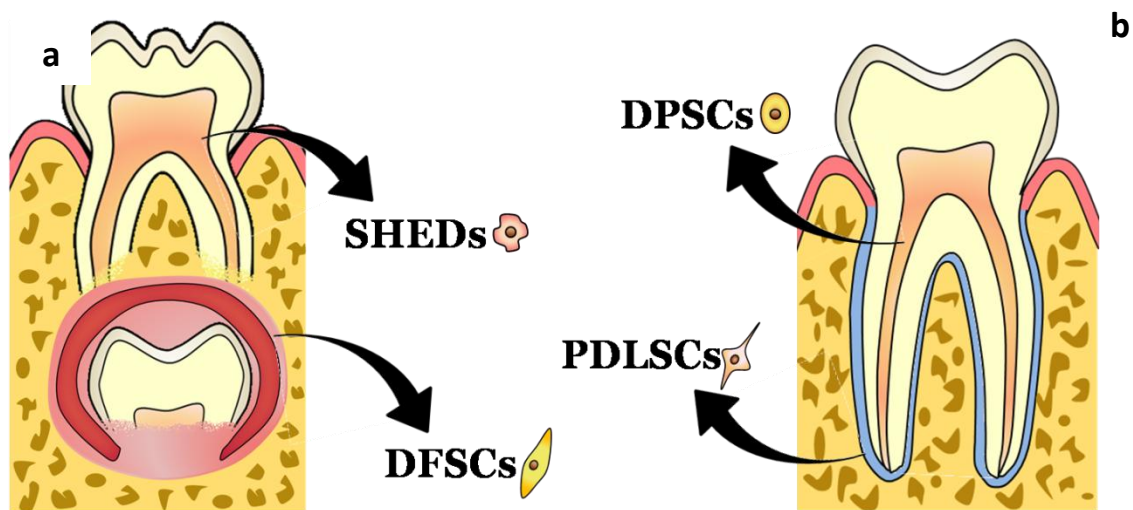


Fig. 1- Cellule staminali isolate da tessuti dentari. a) Cellule staminali dalla polpa di dente deciduo (in inglese per esteso*=SHED) e dal follicolo dentario (*DFSC); b) cellule staminali dalla polpa di dente permanente (*DPSC) e dal legamento parodontale (*PDLSC) (Di Caprio et al. 2009)

3. Scopo della Tesi

È stato ampiamente dimostrato da molteplici studi come il Mineral Trioxide Aggregate non solo sia biocompatibile verso i tessuti circostanti, ma anche in grado di permettere la rigenerazione di tessuti come l'osso, il cemento e la dentina. Tuttavia in letteratura non sono presenti studi che ineriscano l'attività dell'MTA su cellule staminali mesenchimali, la cui proliferazione e differenziazione è fondamentale per la guarigione e la rigenerazione dei tessuti pulpari e del periapice di cui sono progenitrici. Lo scopo di questo lavoro è stato, dunque, valutare l'abilità dell'MTA nel supportare l'adesione, la proliferazione e la migrazione delle cellule staminali mesenchimali (hMSC).

4. Materiali e Metodi

4.1 Reagenti

I materiali utilizzati in questi esperimenti sono stati ProRoot™ MTA (Dentsply Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA), e un cemento di Portland bianco (Mapei, Italia). I marker fluorescenti rodamina-falloidina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) e CellTracker (Invitrogen, Milano, Italia) sono stati utilizzati per valutare la morfologia cellulare. La vitalità cellulare e la crescita sono state valutate col test all'Alamar blue (Invitrogen, Milano, Italia).

4.2 Colture cellulari

Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) sono state acquistate (Lonza Milano, Milano, Italia) e coltivate in α -MEM con 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL di penicillina in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂ a 37°C. Per raccogliere le cellule, le piastre venivano lavate con 2 mL di PBS (Cat. No. P3816, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e trattate con 1 mL di tripsina/EDTA per 5 minuti. La tripsina veniva, poi, inattivata da 4 mL di α -MEM e le cellule in sospensione venivano raccolte in tubi da centrifuga da 15 mL (Cat. No.2322-15, Iwaki, Barloworld Scientific, Milano, Italia). Le cellule staminali mesenchimali umane sono state sub-coltivate ed usate fino al settimo passaggio.

4.3 Microscopia confocale

Il Microscopio confocale è un microscopio ottico a cui viene sovrapposto un apparato che si occupa di illuminare e rilevare l'immagine di un campione con una scansione punto a punto. Il più diffuso è denominato CLSM, confocal laser

scanning microscope, che permette di focalizzare con estrema precisione un laser sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo.

Le caratteristiche della luce laser (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica) consentono di evitare fenomeni di aberrazioni e diffrazioni tipiche invece della luce prodotta da tradizionali lampade a incandescenza. Inoltre, le lenti dell'obbiettivo fanno sì che l'intensità della luce laser sia sufficiente a eccitare i fluorocromi soltanto nel punto di massima concentrazione del raggio, corrispondente al piano di messa a fuoco dell'obbiettivo. In questo modo le aree superiori ed inferiori al piano di fuoco, non venendo eccitate, non contribuiscono alla formazione dell'immagine, limitando la formazione di aloni e riducendo il 'rumore di fondo'

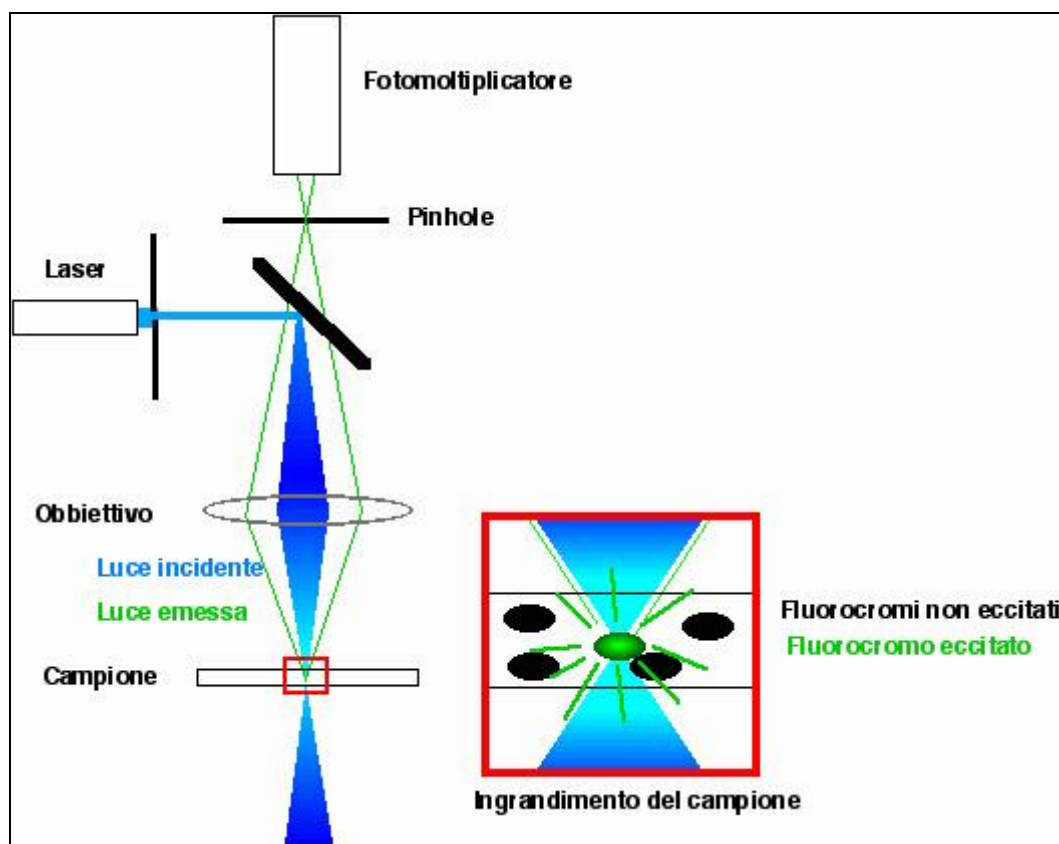


Fig.2- Funzionamento del CLSM

La luce emessa dai fluorocromi presenti nel campione viene catturata dalle lenti dell'obbiettivo e deviata da uno specchio dicroico (linea nera diagonale) su un fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico di intensità proporzionale. Tra lo specchio dicroico e il fotomoltiplicatore, il fascio luminoso attraversa un diaframma (o pinhole), che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco (che, seppure in minima parte vengono illuminate per effetto di fenomeni di rifrazione all'interno del campione) di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo dal piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale. Il segnale elettrico in uscita dal fotomoltiplicatore viene quindi digitalizzato e inviato ad un computer che registra i valori di intensità misurati per ogni punto. Questi valori vengono utilizzati per ricostruire l'immagine a video: ogni punto del campione verrà cioè a corrispondere ad un pixel dello schermo, e l'intensità luminosa del punto verrà rappresentata da una corrispondente tonalità di grigio. L'accostamento di tutti i singoli pixel corrispondenti ai punti scanditi dal fascio laser nel campione darà così l'immagine finale.

4.3.1 Valutazione con CellTracker rosso

Il reagente CellTracker-CMTPX è un derivato fluorescente del clorometile che può liberamente diffondere attraverso la membrana delle cellule vive. Il CellTracker è una sonda moderatamente reattiva ai tioli ed una volta penetrato nelle cellule, in ambiente riducente (138) probabilmente mediante una reazione mediata dalla glutiazione S-trasferasi, come dimostrato in vitro (138,139) il reagente si trasforma in un composto tioetere fluorescente e colorante che può

essere fissato con aldeidi, permettendo una permanenza e lungo termine. La variante rossa non richiede clivaggio enzimatico per attivare la fluorescenza. La reazione anidra produce cloromatilcumarina che ha un'eccellente ritenzione, una forte fluorescenza e una distribuzione citoplasmatica uniforme.

Il marker CellTracker è ampiamente utilizzato in letteratura per analizzare al microscopio confocale la vitalità, lo stato metabolico delle cellule, la morfologia anche di quelle staminali mesenchimali (140).

In questo studio il ProRoot MTA e il cemento di Portland bianco sono stati miscelati separatamente e lasciati indurire per 24h. Le cellule del gruppo controllo sono piastrate in chamber slide, con una concentrazione di 50.000 cellule/slide, mentre le cellule appartenenti ai gruppi MTA e Cemento di Portland sono piastrate sui cementi miscelati 24 h prima sul fondo della chambre slide, alla medesima concentrazione. Le hMSC piastrate sui campioni sono state dunque osservate dopo 24h di incubazione con Cell Tracker al microscopio confocale (CLSM).

4.3.2 Valutazione con Rodamina-Falloidina

La Rodamina-Falloidina è un marker molto selettivo per la F-actina. La falloidina è alcaloide estratto dai funghi del genere Amanita, specialmente Amanita Phalloides, coniugato al colorante florescente rosso tetrametilrodamina (TRITC). Se usato in concentrazioni nanomolari la falloidina è un marker valido per marcare, identificare e quantificare la quantità di F-actina presente nelle sezioni di tessuti e colture cellulare precedentemente fissati in formaldeide e permeabilizzate o attraverso liposomi cationici. La falloidina inibisce la

depolimerizzazione e si lega ai residui E117, M119, G158, R177, D179, M355 e C374 dell'F-Actina (141-144).

Per queste caratteristiche è un buon marker per valutare la struttura del citoscheletro, l'adesione cellulare ad un substrato, la proliferazione.

Le cellule in questo studio sono state, in un primo gruppo, piastrate e cresciute sull'MTA in presenza di α -MEM standard mentre in un secondo gruppo in presenza di mezzo osteogenico (con aggiunta di FBS). Dopo 5 giorni di proliferazione sull'MTA le cellule sono marcate con rodamina-falloidina e confrontate con quelle del gruppo controllo.

4.4 Test dell' Alamar blue

La vitalità e la proliferazione cellulare sono state valutate attraverso il test dell'Alamar Blue (MABAs) dopo 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 giorni di incubazione in mezzo basale ed osteogenico, tanto per l'MTA quanto per il Cemento di Portland. È stato utilizzando come controllo una popolazione di cellule coltivate in una piastra di polistirene.

L'Alamar Blue è un indicatore di ossidoriduzione, caratterizzato da un colorante, il blu, che in forma ossidata non è fluorescente ma diventa rosa e fluorescente dopo la riduzione ad opera delle cellule vitali. Esso attraversa la membrana delle cellule vitali e il suo metabolita fluorescente rimane all'interno della cellula. La riduzione è mediata dalle deidrogenasi mitocondriali (145). Studi recenti sottolineano un contributo degli enzimi citoplasmatici e microsomiali (146). Il numero di cellule vitali è correlato all'intensità di riduzione del colorante. È un test vantaggioso per la semplicità di utilizzo perché viene aggiunto direttamente alle cellule. Questo test non è tossico per le cellule e gli operatori e non è

radioattivo. La sensibilità è paragonabile all'MTT e al test di incorporazione della timidina, pur essendo più discriminativo per le cellule morte in confronto al primo e non radioattivo al contrario del secondo.

4.5 Test di migrazione in transwell e saggio all'MTT

Il test di migrazione in transwell è stato utilizzato per valutare l'effetto dell'MTA, in confronto a quello del Cemento di Portland, sulla capacità di migrare delle hMSC. I cementi sono stati posti nelle piastre da 6 pozzetti e le cellule sono aggiunte negli inserti da 8 μm ed incubate con i cementi per 18 h in assenza di mezzo osteogenico. Inoltre le cellule venivano anche cresciute, come gruppo controllo, in presenza o in assenza di FBS. Le cellule, poi, di tutti i gruppi, venivano colorate con il saggio all' MTT [3 (4,5 dimethylthiazol 2yl) 2,5diphenyltetrazolium bromide] che fornisce indirettamente informazioni sulla vitalità cellulare, valutando l'attività deidrogenasica. La molecola di MTT, infatti, dopo l'incubazione con cellule vitali, viene clivata dalle deidrogenasi mitocondriali che convertono il sale tetrazolio MTT idrosolubile di colore giallo, in un cristallo formazano insolubile di colore violetto.

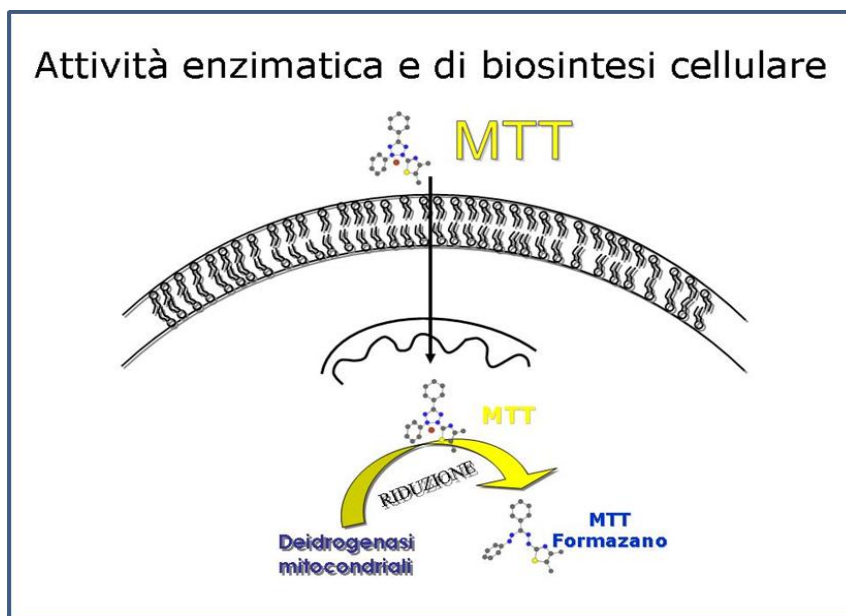


Fig.3: *Meccanismo di azione dell'MTT nella valutazione dell'attività mitocondriale.*

A ciascuna transwell sono stati aggiunti 100 μ L di MTT (1mg/ml) e si incubava per 1h. Successivamente l'MTT è stato sostituito da 100 μ L di DMSO, per consentire la dissoluzione dei cristalli di formazano insolubile formatisi. La piastra è stata agitata delicatamente ed incubata per 15 minuti.

La densità ottica è stata letta attraverso l'uso di uno spettrofotometro (Sunrise microplate reader, Tecan Trading, Lausanne, Switzerland) ad una lunghezza d'onda di 540 nm e con l'uso del software Magellan 6.2 (Tecan).

La media dei valori della densità ottica dell'MTT Test di ogni campione è rappresentativa dell'attività mitocondriale delle cellule dopo l'esposizione ai reagenti. L'attività mitocondriale viene espressa come valore percentuale ed è calcolata nel modo seguente.

$$\% \text{ Attività Mitocondriale} = \text{Assorbanza del campione} / \text{Assorbanza del controllo} \times 100$$

4.6 Microscopio a Forza Atomica

L'AFM è un microscopio a scansione di sonda introdotto nel 1986 da Binnig et al. (107). Esso appartiene alla famiglia dei microscopi a scansione di sonda (SPM) e oltre a memorizzare immagini è anche uno dei principali strumenti di manipolazione della materia su scala nanometrica. Il microscopio a forza atomica (AFM) consiste di una microleva (cantilever) alla cui estremità è montata una punta (tip), tipicamente composta di silicio o nitruro di silicio che ha raggio di curvatura dell'ordine dei nanometri. La punta viene collocata nelle strette vicinanze della superficie del campione di cui effettua la scansione. Tra la punta ed il campione a distanze nanometriche entrano in gioco le forze di Van der Waals le quali provocano una deflessione della microleva (la cui costante elastica è nota) in accordo con la legge di Hooke. La deflessione è misurata utilizzando la luce riflessa di un laser dalla sommità della microleva, il quale verrà rilevato da un fotodiodo a quattro quadranti. Per mantenere costante la distanza della punta dalla superficie del campione, affinché, quest'ultima possa seguire tutte le asperità superficiali dello stesso c'è un circuito di feedback il quale regola la distanza tra la punta e il campione al fine di mantenere costante la forza che agisce tra loro. Generalmente il campione è collocato su un tubo piezoelettrico che può spostarlo in direzione perpendicolare (direzione z) per mantenere una forza costante e nel piano (direzioni x ed y) per analizzarne la superficie. La mappa risultante $s(x,y)$ rappresenta la topografia della superficie campione. Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi metodi di funzionamento per il microscopio ad interazione atomica. I principali metodi di funzionamento sono: a contatto statico (contact mode), ad assenza di contatto

dinamico (non-contact mode) e a contatto dinamico (dynamic mode). Nel funzionamento a contatto, la forza agente tra la punta e la superficie del campione viene mantenuta costante durante la scansione mantenendo una deflessione costante. Questa metodologia è particolarmente utilizzabile per lo studio di cellule vive, DNA e proteine (147-149) o per valutare l'interazione recettore-ligando, per mappare la presenza dei recettori sulla membrana cellulare e la loro collocazione (151).

Nella modalità ad assenza di contatto, la microleva viene fatta oscillare alla frequenza di risonanza. Le forze di interazione tra la punta e la superficie del campione tendono a smorzare l'oscillazione libera della punta; queste variazioni dell'oscillazione in rapporto all'oscillazione esterna di riferimento forniscono informazioni riguardo le caratteristiche del campione. Nel funzionamento a contatto dinamico, la microleva viene fatta oscillare così che possa venire a contatto con il campione ad ogni ciclo e, successivamente, viene applicata la forza necessaria per staccare la punta dal campione. Gli schemi per i funzionamenti ad assenza di contatto e a contatto dinamico includono la modulazione di frequenza e la più comune modulazione di ampiezza. Nella modulazione di frequenza le variazioni della frequenza di oscillazione forniscono informazioni riguardo alle caratteristiche della superficie campione. Nella modulazione di ampiezza (meglio nota come contatto ad intermittenza o modalità tapping), le variazioni nell'ampiezza di oscillazione producono informazioni topografiche della superficie campione. In aggiunta, le variazioni di fase delle oscillazioni nella modalità tapping possono essere usate per discriminare tra differenti tipologie di materiali sulla superficie. Il microscopio a forza atomica presenta diversi vantaggi rispetto al microscopio elettronico. Diversamente da quest'ultimo, che fornisce una proiezione bidimensionale o un'immagine bidimensionale di un campione, l'AFM

produce un reale profilo tridimensionale della superficie. Inoltre i campioni analizzati da un microscopio ad interazione atomica (AFM) non richiedono nessun trattamento speciale (metallizzazione) che potrebbe modificare o distruggere irrimediabilmente il campione. Mentre un microscopio elettronico per un funzionamento corretto necessita di un costoso ambiente sotto vuoto, la maggior parte delle modalità operative del microscopio ad interazione atomica (AFM) funzionano perfettamente nell'ambiente normale o perfino in un ambiente liquido. Ciò lo rende un ottimo strumento per lo studio di macromolecole biologiche e di organismi viventi.

Il principale svantaggio del microscopio a forza atomica (AFM) rispetto al microscopio elettronico a scansione (SEM) consiste nelle dimensioni dell'immagine. Il microscopio a forza atomica (AFM) può riprodurre solo una profondità dell'ordine del micrometro ed un'area massima di circa 100 per 100 micrometri, dimensioni dipendenti dal piezoelettrico di scansione. Un altro inconveniente di tale strumento è che l'elevata risoluzione e la qualità delle immagini sono limitate dal raggio di curvatura della sonda e una scelta errata della sonda può portare anche alla formazione di artefatti. Per effettuare la scansione di un'area ci vogliono tipicamente diversi minuti con un microscopio a forza atomica (AFM). Infine, molte immagini AFM sono caratterizzate dall'isteresi dei materiali piezoelettrici e dai disturbi nella trasmissione prodotta da alterazione o disordine nei segnali fra i diversi canali degli assi (x,y,z). L'immagine deve essere perciò post processata e filtrata con un opportuno software.

In questo studio il microscopio a forza atomica (AFM Perception, Assing, Italy) è stato utilizzato per valutare la topografia superficiale dei cementi. La tecnica di scansione è stata quella di contact mode in aria. Sono state analizzate aree perfettamente quadrate di $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ con una risoluzione di 5nm.

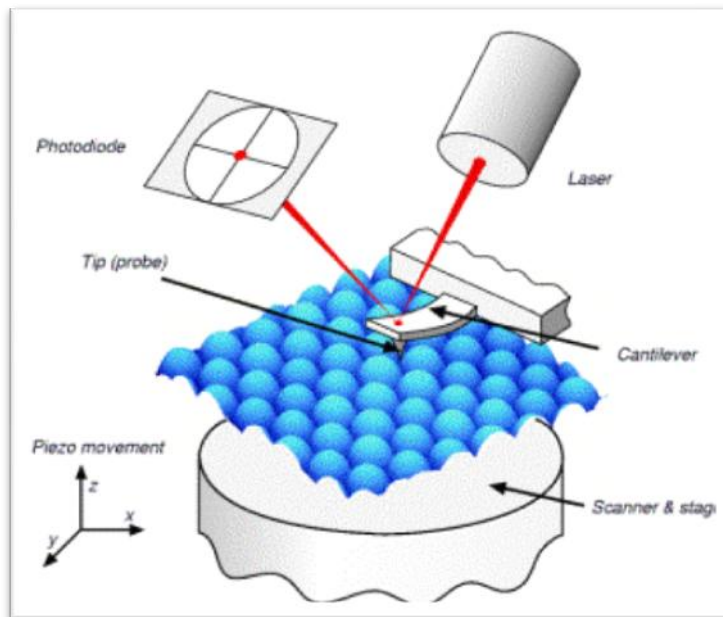


Fig. 4- *Funzionamento dell'AFM*

4.7 Analisi statistica

La significatività statistica dei risultati è stata valutata attraverso l' One way ANOVA seguito da Tukey's post-hoc test con $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ e $p \leq 0.001$.

5. Risultati

5.1 Adesione e morfologia cellulare

Le hMSC, piastrate a contatto con ProRoot MTA e con Cemento di Portland, sono state poi e marcate con CellTracker. Le cellule trattate con MTA mostrano al microscopio confocale di essere attaccate al substrato, dopo 24 h (Fig.6).

L'adesione, tuttavia, del gruppo trattato con MTA risulta peggiore rispetto al gruppo controllo (Fig.5).

Per quanto concerne il gruppo trattato con il Cemento di Portland, le cellule presentano essenzialmente una forma tondeggiante e poche di esse sono adese alla superficie del materiale. (Fig.7).

Dopo 5 giorni di incubazione le cellule adese all'MTA, marcate con rodamina-falloidina e nuovamente viste al CLSM, mostrano una morfologia più poligonale e piatta quando comparate alle cellule della popolazione controllo, sia coltivate in mezzo basale che osteogenico, sottolineando la buona interazione cellule-materiale. (Fig.8 e Fig.9)

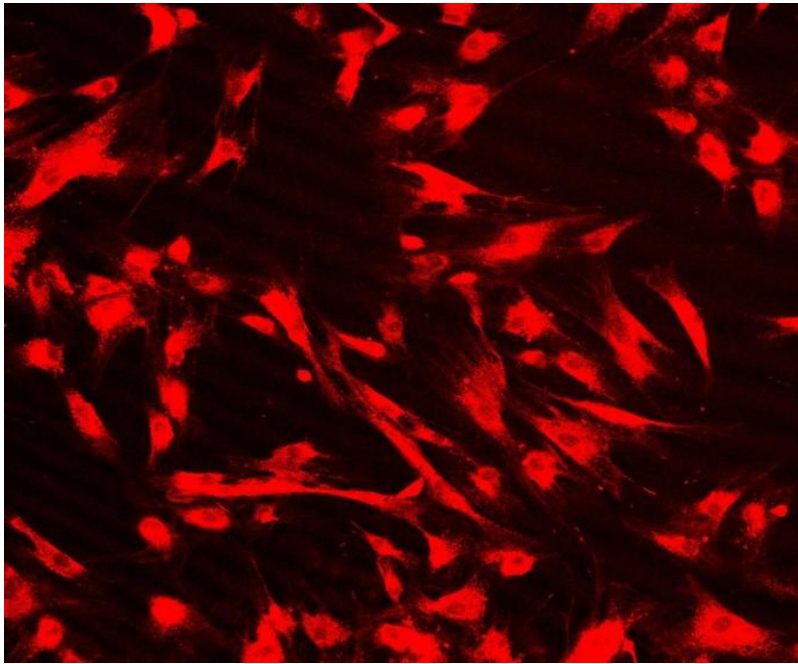


Fig.5- hMSC del gruppo controllo marcate con CellTracker piastrate in chamber slide (20x)

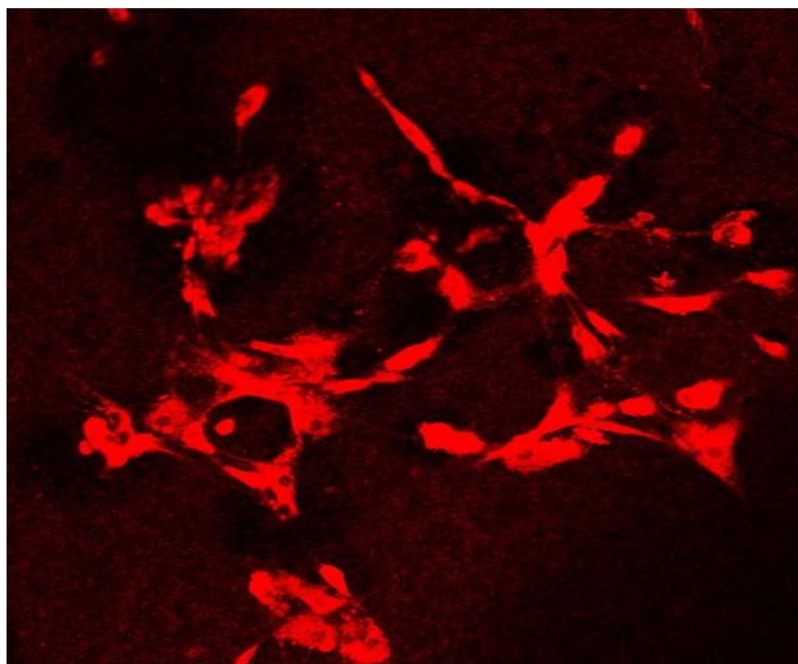


Fig. 6- hMSC marcate con CellTracker adese sull'MTA miscelato 24h prima sul fondo della chamber slide (20x)

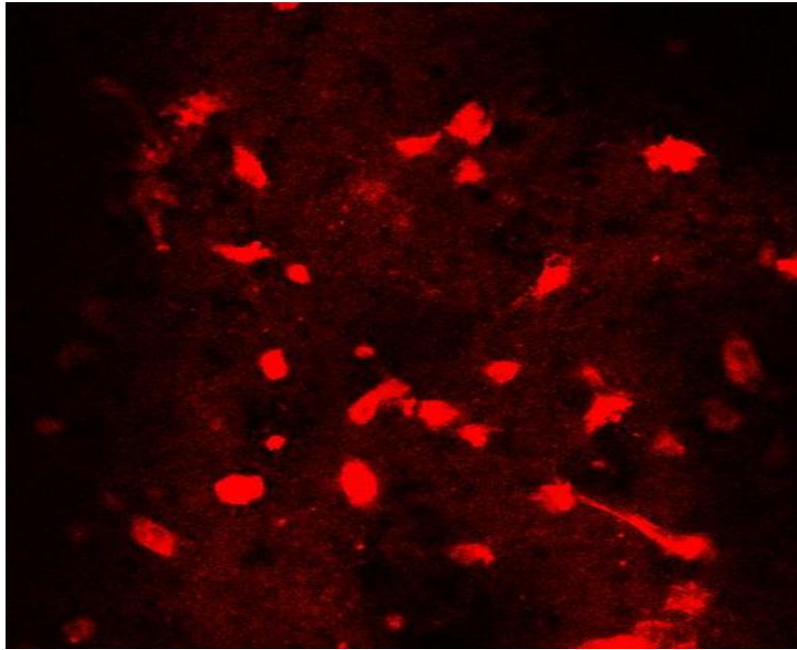


Fig. 7- *hMSC* marcate con CellTracker piastrate sul cemento di Portland miscelato 24h prima sul fondo della chamber slide (20x)

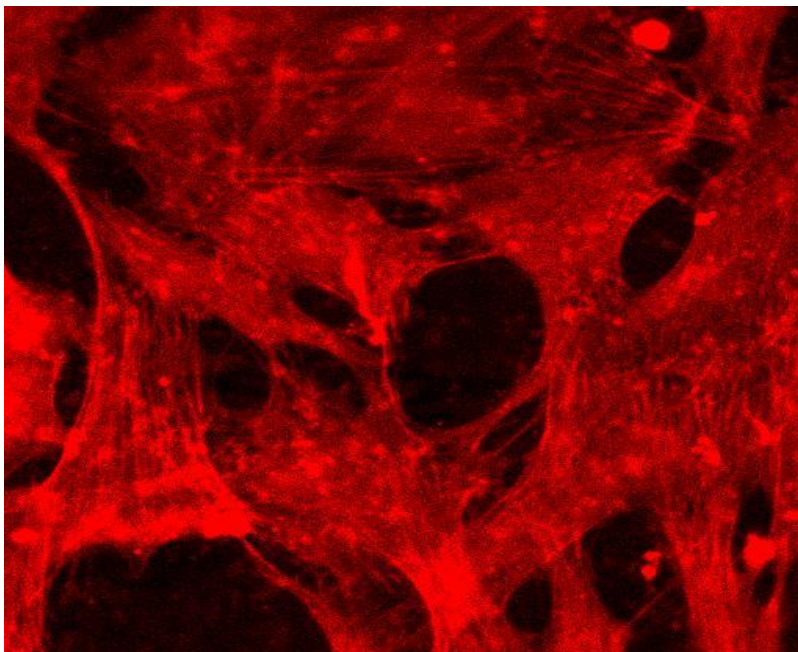


Fig.8- *hMSC* marcate con rodamina-falloidina, piastrate sull'MTA e cresciute in α -MEM standard (63x)

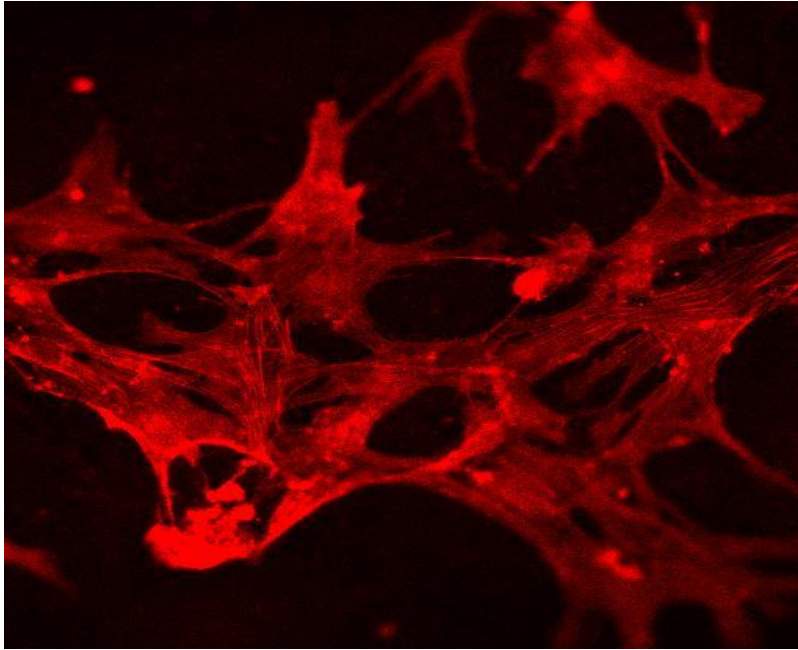


Fig.9- *hMSC* marcate con rodamina-falloidina, piastrate sull'MTA e cresciute in mezzo osteogenico (63x)

5.2 Proliferazione

Il numero di cellule vitali è correlato all'intensità di riduzione del colorante ed è espresso come percentuale della riduzione dell'Alamar Blue. Il test evidenzia che le cellule piastrate su MTA mostrano, in mezzo basale, fino a 7 giorni di incubazione una riduzione della velocità di proliferazione rispetto al controllo. Dopo 14, 21 e 28 giorni la proliferazione delle cellule piastrate sull'MTA aumenta in maniera significativa. Le hMSC in contatto con il cemento di Portland mantengono una velocità di proliferazione più bassa rispetto al gruppo MTA e controllo. (Fig.10)

Anche in presenza di FBS le cellule piastrate su MTA mostrano riduzione della velocità di proliferazione a 7 giorni, seguita da un significativo incremento nelle rilevazioni successive. Le cellule trattate con il Cemento di Portland confermano in presenza di mezzo osteogenico una riduzione della velocità di proliferazione.

La proliferazione è comunque minore per tutti i gruppi cresciuti in mezzo osteogenico rispetto al mezzo standard (Fig.11).

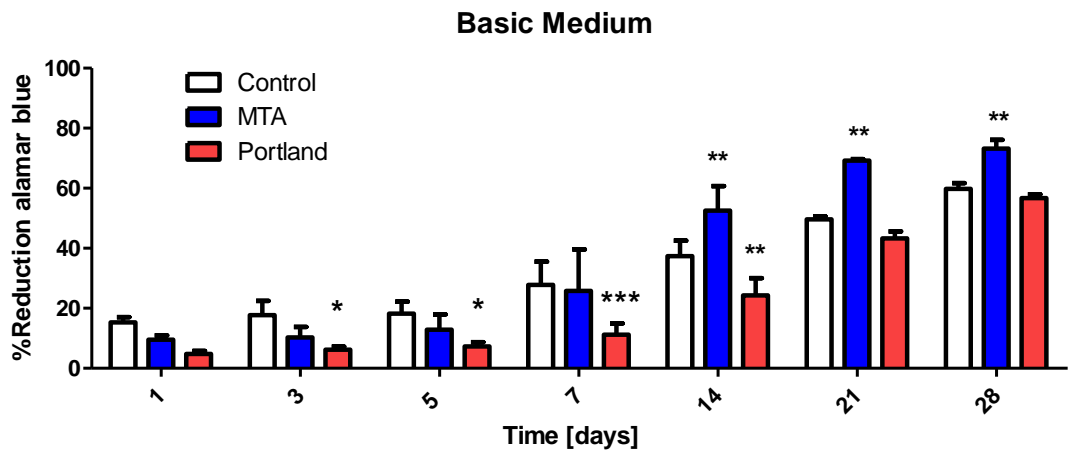


Fig.10- Proliferaazione cellulare delle h MSC piastrate su piastra di polistirene (controllo) e su MTA e Cemento di Portland in α -MEM standard. Riduzione dell' Alamar a 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 giorni

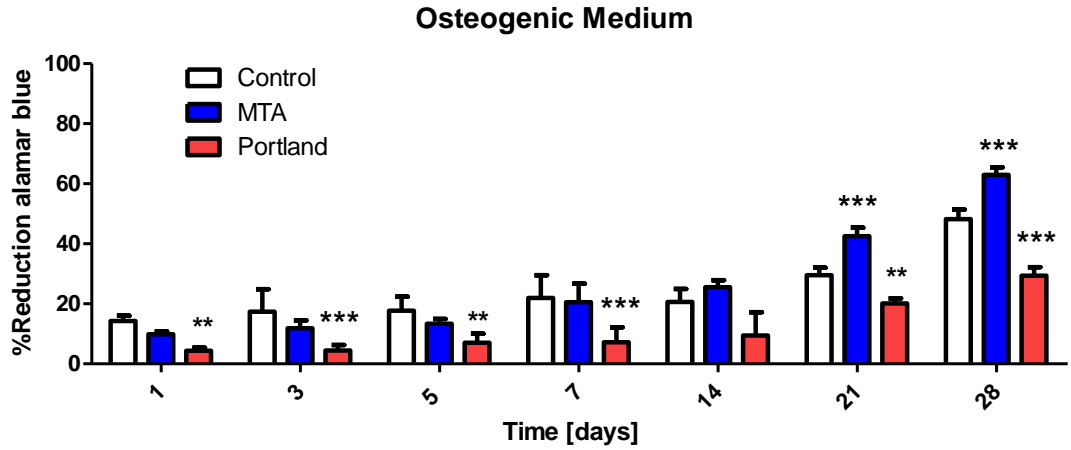


Fig.11- Proliferaazione cellulare delle hMSC piastrate su piastra di polistirene (controllo) e su MTA e Cemento di Portland in mezzo osteogenico. Riduzione dell' Alamar a 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 giorni.

5.3 Migrazione cellulare e MTT test

Le cellule del controllo in presenza di mezzo base non mostrano migrazione cellulare, cosa che invece è riscontrabile nel controllo con mezzo osteogenico. Il ProRoot MTA mostra anch'esso capacità di indurre migrazione in assenza di mezzo osteogenico al contrario del Cemento di Portland che non mostra induzione della migrazione.(Fig.12a)

Le cellule presenti a livello della membrana di policarbonato sono state, inoltre, analizzate con l'MTT test. Il saggio mostra che la maggiore quantità di cellule vitali sono reperite in presenza dell'MTA anche se in misura minore rispetto al controllo, in presenza di mezzo osteogenico (FBS 20%). (Fig. 12b e Fig.13).

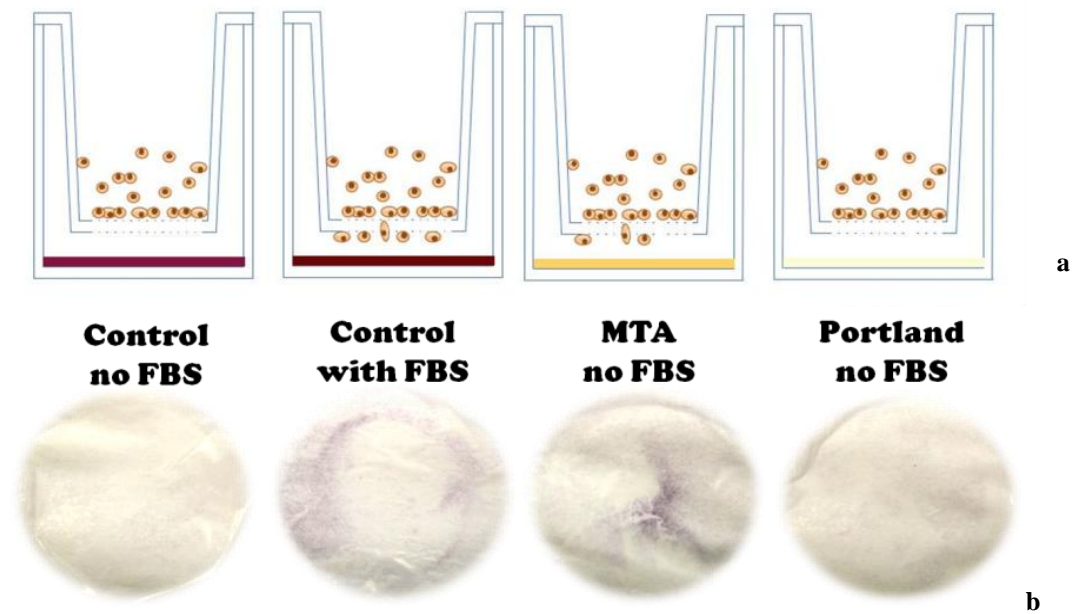


Fig.12- a) Test di migrazione cellulare, effettuato in transwell con pori da 8 micrometri, su controllo e dopo incubazione per 18h con i cementi. b) Foto delle membrane in policarbonato con le hMSC colorate con MTT.

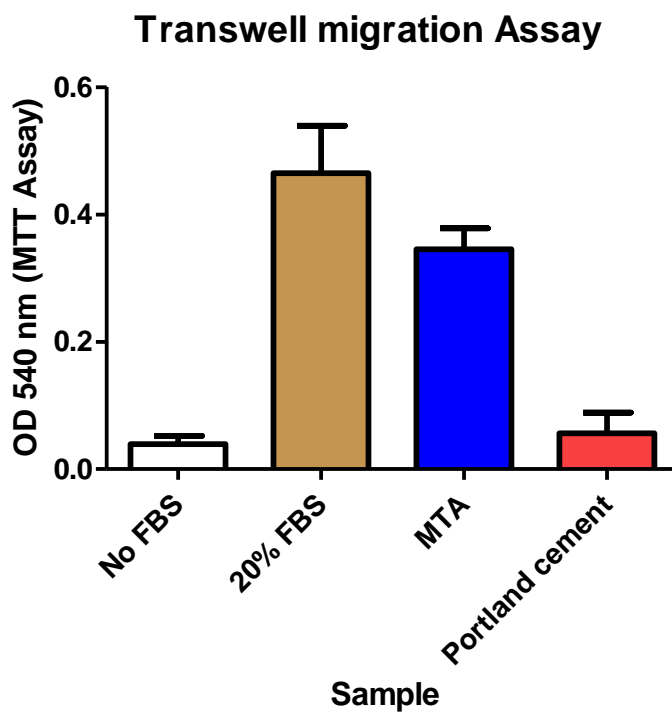
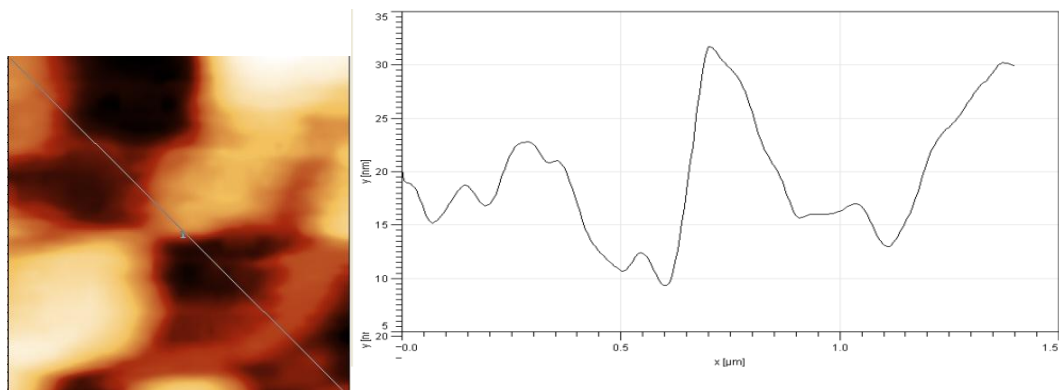
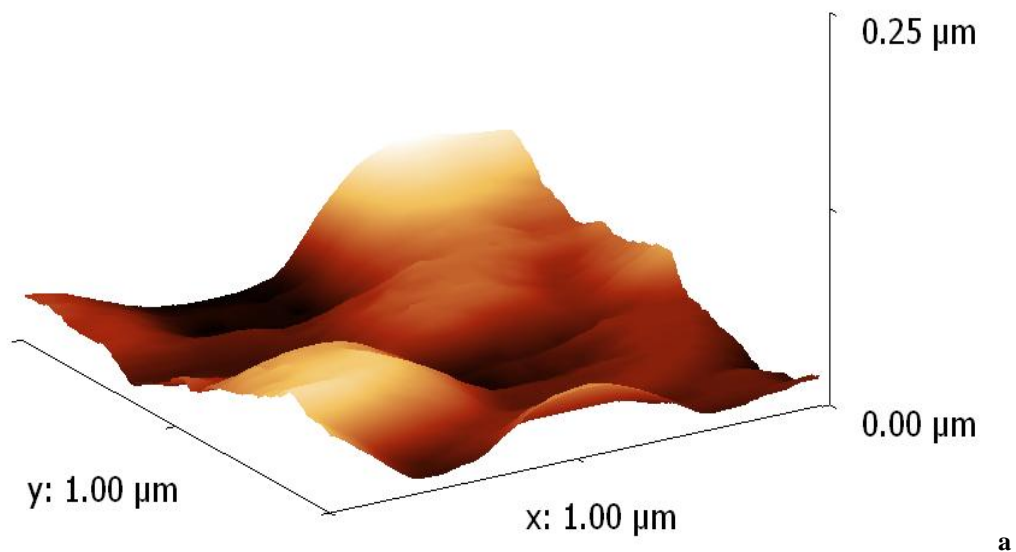


Fig.13- Valore di assorbanza dopo l'MTT test.

5.4 Topografia di superficie

L'AFM rivela differenze di superficie significative tra i due cementi sia nell'analisi in 3D, 2D che del profilo. L'MTA mostra un profilo nanostrutturato con una maggiore rugosità rispetto al cemento di Portland. (Fig.14a e Fig. 14b) Quest'ultimo, invece, presenta caratteri di maggiore omogeneità e un profilo più liscio e regolare. (Fig 15a e 15b).



b

c

Fig.14- Aree perfettamente quadrate di $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ sono state analizzate con una risoluzione di 5nm attraverso l' AFM a) Immagine 3D b) Immagine 2D e c) profilo della superficie del cemento MTA.

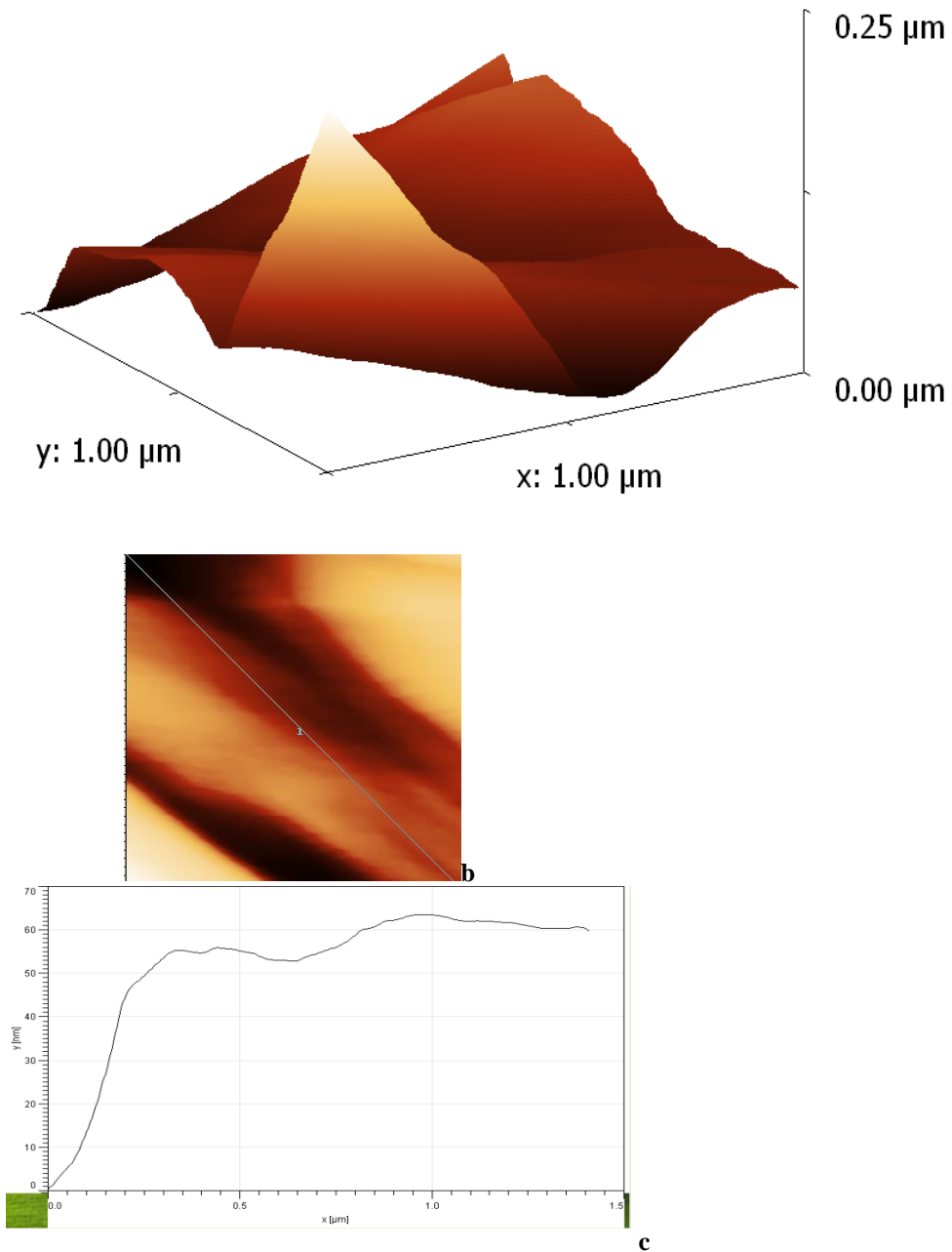


Fig.15- Aree perfettamente quadrate di $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ sono state analizzate con una risoluzione di 5nm attraverso l' AFM a) Immagine 3D b) Immagine 2D e c) profilo della superficie del Cemento di Portland.

6. *Discussione*

Da quando è stato posto all'attenzione della comunità scientifica, il Mineral Trioxide Aggregate è divenuto oggetto di studio circa la sua biocompatibilità. In prima istanza sono stati valutati gli effetti lesivi che questo cemento poteva determinare a livello cellulare, quindi la citotossicità e la genotossicità in vitro. L'MTA, è risultato essere scarsamente citotossico rispetto a Super-EBA e IRM, soprattutto quando già indurito a 24 h (16, 17, 67, 72-74). Il materiale è risultato, inoltre, essere innocuo riguardo alla sua potenziale mutagenicità e genotossicità, allo stesso modo anche Super-EBA e IRM e cemento di Portland (72-74, 76). I test utilizzati sono nella letteratura molteplici: MTT, Trypan Blu, XTT, Comet test alcalino e anche le cellule testate sono le più svariate, di origine mesenchimale. Grossa importanza hanno assunto gli studi circa l'azione istolesiva del materiale, di natura infiammatoria. Posta la scarsa citotossicità del cemento, l'attenzione degli studiosi si è concentrata soprattutto sulle capacità di induzione della proliferazione e della differenziazione cellulare in vitro e sulle possibilità rigenerative del materiale in vivo (77-108). Infatti la crescita, la proliferazione e la differenziazione di linee cellulari progenitrici dei tessuti danneggiati sono essenziali per la guarigione e la rigenerazione del tessuto stesso. La capacità dell'MTA di permettere l'adesione e la proliferazione delle cellule era stata precedentemente investigata su campioni di cemento, sottoposti a trattamenti di superficie, utilizzando gli osteoblasti (61, 152) ma nessuno studio era stato finora condotto per valutare l'effetto dell'MTA su cellule staminali mesenchimali.

Nel nostro studio le hMSC piastrate sul ProRoot-MTA mostrano a 24 h al CLSM di aderire al substrato e la vitalità cellulare è conservata anche a 5 giorni in maniera maggiore rispetto a quelle piastrate sul cemento di Portland, sia in mezzo basale che osteogenico. L'interazione cellulare con l'MTA è risultata buona. Risultati, questi, in linea con gli studi precedenti di Koh et al (1997) su colture di MG63, che valutavano anch'essi la morfologia delle cellule a contatto con l'MTA sottolineandone la tendenza ad aderire e a proliferare a contatto con il substrato e la forma allungata fibroblasto-simile (38). Dello stesso avviso Perez et al.(2003) e Oviir (2006), che sottolineavano per le stesse cellule una maggiore affinità verso l'MTA bianco rispetto al grigio per la maggiore porosità superficiale del primo (78, 82), Balto (2004) che utilizzava anch'egli materiale indurito, dopo 24 h e sottolineava la presenza di elementi cellulari ben aderenti e vitali (68), Nakayama et al. che avevano studiato cellule ossee di topo al SEM e al TEM (87) e Perinpanayagam e Al-Rabeah (2009) (90).

Nel nostro lavoro il test all'Alamar blue evidenzia dopo il 14° giorno di incubazione con MTA un aumento di proliferazione rispetto al controllo e al cemento di Portland tanto in mezzo basale che osteogenico. Dati questi che sottolineano, in accordo con la letteratura precedente, non solo che l'MTA non è tossico per le cellule ma anche che permette una proliferazione in vitro. Koh et al. e Mitchell et al. (1999), infatti, avevano sottolineato la capacità dell'MTA di indurre rispettivamente la sintesi di IL-1 β e IL-6 e dunque della proliferazione. Ancora, Huang et al. (2003) avevano rilevato l'espressione di ERKs-1 e 2, kinasi implicate nel pathway di trasduzione del segnale per la proliferazione, in cellule U2OS (83). Anche secondo Nakayama et al (2005) e Takita et al (2006) l'MTA induceva proliferazione.

Importante è sottolineare che nel nostro studio, nella prima settimana di incubazione si assiste ad una riduzione della proliferazione cellulare, dovuto probabilmente all'effetto citotossico iniziale dato soprattutto dal calcio (65, 70). Altrettanto importante da valutare la capacità dell'MTA di indurre proliferazione, anche se in maniera minore rispetto al mezzo base, in presenza di mezzo osteogenico, che induce maggiore differenziazione a scapito della proliferazione.

La capacità di migrazione delle cellule mesenchimali in presenza di MTA è stata valutata attraverso il transwell-test. In presenza di mezzo con siero (controllo positivo) si è riscontrata la maggiore quantità di migrazione cellulare nel test in transwell, ma una quota significativa di migrazione cellulare è osservabile anche in presenza di MTA senza siero anche se in misura minore rispetto al controllo positivo. Al contrario, il Cemento di Portland non sembra indurre migrazione, al pari del controllo negativo, il mezzo senza siero.

L'analisi all'AFM sulla morfologia di superficie mette in risalto le caratteristiche dell'MTA rispetto al Cemento di Portland che possono essere alla base dei differenti risultati ottenuti circa l'abilità di adesione e proliferazione delle hMSC a contatto con i due cementi.

7. *Conclusione*

I risultati di questo studio mostrano che l'MTA è capace di promuovere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali. Essendo la crescita, la proliferazione e la differenziazione delle cellule eventi cruciali per il processo di guarigione dei tessuti danneggiati l'utilizzo dell'MTA nelle applicazioni cliniche in contatto con il tessuto osseo potrebbe potenziare i meccanismi di rigenerazione di quest'ultimo.

Referenze Bibliografiche

1. Torabinejad M, White DJ. Tooth filling material and use. US Patent Number, 5,769,638; May 1995.
2. Torabinejad M, Hong CU, Mc Donald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21: 349-53.
3. Owadally ID, Chong BS, Pitt Ford TR, Watson TF. The sealing ability of IRM with the addition of hydroxyapatite as a retrograde root filling. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 211-5.
4. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. The sealing ability of a mineral trioxide aggregate as a retrograde root filling material. *J Endod* 1993; 19: 591-5.
5. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Effects of blood contamination of dye leakage of root-end filling materials. *J Endod* 1994; 20: 159-6.
6. Torabinejad M, Falah Rastegar A, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root end filling material. *J Endod* 1995; 21: 109-112.
7. Bates CF, Carnes DL, Del Rio CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod*. 1996; 22: 575-8.
8. Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root-end filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12: 161-78.
9. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root end filling material in monkeys. *J Endod* 1997; 23: 225-8.
10. Torabinejad M, Hong C, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root end filling in dogs. *J Endod* 1995; 21: 603-8.
11. Wu MK, Kontakiotis EG, Wesselink PR. Long-term seal provided by some root-end filling materials. *J Endod* 1998; 24: 557-60.
12. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of Endodontic materials. *J Endod* 1998; 24: 91-6.
13. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root-end filling materials. *J Endod* 1995b; 21: 403-6.
14. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi HR, McMillan P. A comparative study of rootend induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* 1999; 25: 1-5.
15. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; 25: 197-205.
16. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995; 21: 489-92.
17. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000; 26: 288-91.
18. Tang HM, Morrow SG, Kettering JD, Torabinejad M. Endotoxin leakage of four root end filling materials. *J Endod* 1997; 23: 259.
19. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993; 19: 541-4.
20. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe´ PFE, Dezan JR E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999; 25: 161-6.
21. Hartwell GR, England MC. Healing of furcation perforations in primate teeth after repair with decalcified freeze-dried bone: a longitudinal study. *J Endod* 1993; 19: 357-61.
22. Sluyk SR, Moon PC, Hartwell GR. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. *J Endod* 1998; 24: 768-71.
23. Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 1997; 23: 259.
24. Arens DE, Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. *Oral Surg* 1996; 82: 84-8.

25. Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA. Mineral trioxide aggregate: a new material for Endodontics. *J Am Dent Assoc* 1999; 130: 967- 75.
26. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp capping material. *J Am Dent Assoc* 1996; 127: 1491-4.
27. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 1995; 79: 756-62.
28. Holland R, De Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Dezan E. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *Journal of Endod* 2001; 27: 281-4.
29. Villa P, Fernandez R. Apexification of a replanted tooth using mineral trioxide aggregate. *Dent Traum* 2005; 21: 306-308.
30. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traum* 2005; 21: 1-8.
31. Glickman GN, Kenneth A. 21st-Century Endodontics. *JADA* 2000; 131: 39-46.
32. Shabahang S, Torabinejad M. Treatment of teeth with open apices using mineral trioxide aggregate. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 2000; 12: 315-20.
33. Main C, Mirzagan N, Shabahang Sh, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod* 2004; 30: 80-3.
34. Ghodduji J, Sanaan A, Shahrami F. Clinical and Radiographic Evaluation of Root Perforation Repair Using MTA. *NYSDJ* 2007; 73: 46-49.
35. Tawil PZ, Trope M, Curran AE, Caplan DJ, Kirakozova A, Teixeira FB. Periapical Microsurgery: An In Vivo Evaluation of Endodontic Root-End Filling Materials. *J Endod* 2009; 35: 357-362.
36. Al-Hezaimi K, Naghshband J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Comparison of Antifungal Activity of White-Colored and Gray-Colored Mineral Trioxide Aggregate (MTA) at Similar Concentrations Against *Candida albicans*. *J Endod* 2006; 31: 365-357.
37. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* 2005; 21: 297-303.
38. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 432-439.
39. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza VD, Nery MJ, Bernabe PFE, Dezan E. Mineral Trioxide Aggregate Repair of Lateral Root Perforations. *J Endod* 2001; 27: 281-284.
40. Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 809-15.
41. Duarte MAH, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. PH and calcium ion release of 2 root-filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 345-7.
42. Oliveira MG, Xavier CB, Demardo FF, Pinheiro ALB, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Brazilian Dental Journal* 2007; 18: 3-7.
43. Roy CO, Jeansonne BG, Gerrets TF. Effect of an acid environment on leakage of root-end filling materials. *J Endod* 2001; 27: 7-8.
44. Fridland M, Rosado R, Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Solubility and Porosity with Different Water-to-Powder Ratios *J Endod* 2003; 29: 814-817.
45. Fridland M, Rosado R. MTA Solubility: A Long Term Study. *J Endod* 2005; 31: 376-9.
46. Islam I, Chng HK, Yap AUJ. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland Cement. *J Endod* 2006; 32: 193-7.
47. Lee YL, Lee BS, Lin FH, Lin AY, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 2004; 25: 787-793.
48. Hardy I, Liewehr FR, Joyce AP, Agee K, Pashley DH. Sealing ability of One-Up Bond and MTA with and without a secondary seal as furcation perforation repair materials. *J Endod* 2004; 30: 658-61.

49. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD e Thomas, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaption of Mineral Trioxide Aggregate and other commonly used root–endfilling materials. *J Endod* 1995; 21: 295-99.
50. Peters CI e Peters AO. Occlusal loading of S.EBA and MTA root end filling materials in a computer controlled masticator: A scanning electron microscopy study. *Intern Endod J* 2002; 35: 22- 29.
51. Aminoshariae A, Hartwell GR, Moon PC. Placement of Mineral Trioxide Aggregate using two different techniques. *J Endod* 2003; 29: 679-82.
52. Gondim E, Zaia A, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Texeira FB, Souza-Filho FJ. Investigation of the marginal adaption of root end filling materials in root- end cavities prepared with ultrasonic tips. *Intern. Endod J.* 2003; 36: 491-99.
53. Yatsushiro JD, Baumgartner JC, Tinkle JS. Longitudinal study of the microleakage of two root-end filling materials using a fluid conductive system. *J Endod* 1998; 24: 716–9.
54. Wu MK, Kontakiotis EG, Wesselink PR. Long-term seal provided by some root-end filling materials. *J Endod* 1998; 24: 557–60.
55. Weldon JK Jr, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF. Sealing ability of mineral trioxide aggregate and super-EBA when used as furcation repair materials: a longitudinal study. *J Endod* 2002; 28: 467–70.
56. Lamb EL, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, Pashley DH Effect of root resection on the apical sealing ability of mineral trioxide aggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 732–5.
57. Caroline R. A Valois, Edson D. Costa Jr. Influence of the thichness of Mineral Trioxide Aggregate on sealing ability of root end filling in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 108-11.
58. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chiminal study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000; 11:3-9
59. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral trioxide aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J* 2005; 38: 539–43.
60. Al-Nazhan S, Al-Judai A. Evaluation of Antifungal Activity of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2003; 29: 826-827.
61. Al-Hezaimi K, Al-Hamdan K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JHS, Rotstein I. Effect of white-colored Mineral Trioxide Aggregate in different concentrations on *Candida albicans* in vitro. *J Endod* 2005; 31: 684-6.
62. Eldeniz A.U, Hadimli HH, Ataoglu H. e Ørstavik D. Antibacterial Effect of Selected Root-End Filling Materials *J Endod* 2006; 32: 345-349.
63. Hui Zhang, Pappen FG, Haapasalo M. Dentin Enhances the Antibacterial Effect of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. *J Endod* 2009; 35: 221-224.
64. Williams DF. Definitions in Biomaterials. Proceeding of consensus conference of the European society for Biomaterials. England Co 4, New York: Elsevier 1986.
65. Lin Sun Z, Wataka JC, Hanks CT. Effects of metal ions on osteoblast- like cell metabolism and differentiation. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 34: 29-37.
66. Valey JW, Smonian PT, Conrad EU. Carcinogenicity and metallic implants. *Am J Orthod* 1995; 24: 319-24.
67. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 483–9.
68. Balto A H. Attachment and Morphological Behavior of Human Periodontal Ligament Fibroblasts to Mineral Trioxide Aggregate: A Scanning Electron Microscope Study *J Endod* 2004; 30: 25-29.
69. Gorduysus M, Avcu N , Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic Effects of Four Different Endodontic Materials in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Endod* 2007; 33: 1450–1454.

70. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yan M, Chou MJ, Kao CT. Biocompatibility of Human Osteosarcoma Cells to Root End Filling Materials. *J Biomed Mater Res 2005 B: Appl Biomater* 72B: 140–145.
71. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Intern Endodontic J* 2005; 38, 604–9.
72. Ribeiro DA, Duarte MAH, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility In Vitro Tests of Mineral Trioxide Aggregate and Regular and White Portland Cements. *J Endod* 2005; 31: 605-607.
73. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101: 258–61.
74. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Ex-vivo biocompatibility tests of regular and white forms of mineral trioxide aggregate. *Intern Endodontic J* 2006; 39: 26–30.
75. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA-Angelus. *Journal of Oral Science* 2008; 50: 397-402.
76. Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweik H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Intern Endodontic J* 2009; 42: 227–237.
77. Mitchell PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999; 20: 167-173.
78. Perez AL, Spears R, Gutmann JL, Oppermann LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and white MTA. *Intern Endodontic J* 2003; 36: 564-570.
79. Pistorius A, Willershausen B, Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. *Intern. Endod J* 2003; 36: 610-15.
80. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ e Kirkwood KL. Cementoblasts Maintain Expression of Osteocalcin in the Presence of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2003; 29: 407-412.
81. Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S. Effects of Mineral Trioxide Aggregate on Cell Survival, Gene Expression Associated with Mineralized Tissues, and Biomineralization of Cementoblasts. *J Endod* 2009; 35: 513–519.
82. Oviir T, Pagoria D, Ibarra G, Geurtsen W. Effects of gray and white mineral trioxide aggregate on the proliferation of oral keratinocytes and cementoblasts. *J Endod* 2006; 32: 210–3.
83. Huang TH, Ding SJ, Hsu TC, Kao CT. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogenactivated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials* 2003; 24: 3909–3913.
84. Rezende T, Vargas D, Cardoso FP, Sobrinho APR, Vieira LQ. Effect of MTA on cytokine production by peritoneal macrophages. *Intern. Endod J* 2005; 38: 896-903.
85. Haglund R, He Jarvis J, Safavi KE, Larz SW, Spanberg, Zhu Q. Effects of root endfilling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 739-45.
86. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Tatiana M, Botero TM, Mc Donald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod* 2005; 31: 387-91.
87. Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *Intern Endodontic J* 2005; 38: 203–210.
88. Takita T, Hayashi M, Takeichi, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka, Ito. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Intern Endodontic J* 2006; 39: 415–422.

89. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The Effect of Mineral Trioxide Aggregate on the Mineralization Ability of Rat Dental Pulp Cells. *J Endod* 2008; 34: 1057-1060.
90. Perinpanayagam He, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: 590-596.
91. Torabinejad M, Chan-Ui-Hong, Thomas R. Pitt Ford and Kariyawasam S. Tissue reaction to implanted Super EBA and Mineral Trioxide Aggregate in the mandible of Guinea pigs: A preliminary report. *J Endod* 1995; 21: 569-71.
92. Sousa CJA, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JCG, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *Intern Endodontic J* 2004; 37: 738-748.
93. Moreton TR, Brown CE, Legan J, Kafrawy AH Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. 2000 John Wiley & Sons, Inc.
94. Yaltrik M, Ozbas H, Bilge Bilgic B, Jssever H. Reactions of connective tissue to MTA and Amalgam. *J Endod* 2004; 30: 95-99.
95. Holland R, Pinheiro CE, Mello W, Nery MJ, Souza V. Histochemical analysis of the dogs dental pulp after pulp capping with calcium, barium, and strontium hydroxides. *J Endod* 1982; 8: 444-7.
96. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxidecontaining cement. *Arch Oral Biol* 1991; 36: 117-28.
97. Economides N, Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas D. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. *Intern Endodontic J* 2003; 36: 44-48.
98. Matt GD, Thorpe JR, Strother JM e McClanahan SB. Comparative Study of White and Gray Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Simulating a One- or Two-Step Apical Barrier Technique. *J Endod* 2004; 30: 876-879.
99. Felipe WT, Felipe MCS, Rocha MJC. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Intern Endodontic J* 2006; 39: 2-9.
100. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YHM, Chiang CP. Regenerative Endodontic Treatment for Necrotic Immature Permanent Teeth. *J Endod* 2009; 35: 160 -164.
101. Tawil PZ, Trope M, Curran AE, Caplan DJ, Kirakozova A, Duggan DJ, Teixeira FB. Periapical Microsurgery: An In Vivo Evaluation of Endodontic Root-End Filling Materials. *J Endod* 2009; 35: 357-362.
102. Hashem AAR, Hassanien EE. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM used to Repair Large Furcation Perforations: Sealability Study. *J Endod* 2008; 34: 59-61.
103. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Intern Endodontic J* 2002; 35: 245-254.
104. Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA. Histological and Scanning Electron Microscopy Assessment of Various Vital Pulp-Therapy Materials. *J Endod* 2003; 29: 324-333.
105. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of Hard Tissue After Experimental Pulp Capping Using Dentin Sialoprotein (DSP) as a Marker. *J Endod* 2003; 29: 646- 650.
106. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Stowe S, Eslami B, Eskandarizade A, Shabahang S. A comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. *Dent Traumatol* 2005; 21: 150-154.
107. Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Bauer JRO, Grande RHM, Murata SS, Souza V, Holland R. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. *Intern Endodontic J* 2009; 42: 122-128.
108. Nair PNR, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int End Journal* 2008; 41: 128-150.

109. Robey PG, Bianco P. The use of adult stem cells in rebuilding the human face. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137: 961-72.
110. Di Caprio MP, Spagnuolo G, Ametrano G, Valletta A, Simeone M, Rengo S. Introduzione alle cellule staminali e all'odontoiatria rigenerativa. *Giornale italiano di Endodonzia* 2010; 24: 40-45.
111. Badorff C, Dimmeler S. Neovascularization and cardiac repair by bone marrow-derived stem cells. *Hand Exp Pharmacol* 2006; 174: 283-298.
112. Jansen J, Thompson JM, Dugan MJ. Peripheral blood progenitor cell transplantation. *Ther Apher* 2002; 6: 5-14.
113. Mizuno H, Hyakusoku H. Mesogenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch* 2003; 70: 300-306.
114. Korbling M, Robinson S, Estrov Z, Champlin R, Shpall E. Umbilical cord blood derived cells for tissue repair. *Cytotherapy* 2005; 7: 258-261.
115. Seo BM, Miura M, Sonoyama W. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 2005; 84: 907-912.
116. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-390.
117. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988; 136: 42-60.
118. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-50.
119. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-49
120. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-84.
121. Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Robey PG. Post-natal skeletal stem cells. In: Lanza RP, ed. *Methods in enzymology: Stem cell*.
122. Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. In: Lanza RP, ed. *Handbook of adult and fetal stem cells*. San Diego: Academic Press 2004; 415-24.
123. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 331-40.
124. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
125. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1335-47.
126. Miura M, Gronthos S, Zhao M. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2003; 100: 5807-5812.
127. Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 359- 372.
128. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative Endodotics: a review of current status and a call for action. *J Endod* 2007; 33: 377-390.
129. Gronthos S, Brahim J, Li W et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-535.
130. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006; 206: 693-701.
131. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res.* 2006; 85: 966-979.
132. Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004; 364: 149-55.
133. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000. 2006; 41: 30-47.
134. Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res* 2001; 36: 71-79.

135. Gould TR, Melcher AH, Brunette DM. Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodontal Res* 1980; 15: 20–42.
136. Handa K, Saito M, Tsunoda A, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res* 2002; 43: 406-408.
137. Moersczeck C, Gotz W, Schierholtz J, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005; 24: 155-165.
138. Lantz RC, Lemus R, Lange RW et al. Rapid reduction of intracellular glutathionein human bronchial epithelial cells exposed to occupational levels of toluene diisocyanate. *Toxicol Sci* 2001; 60: 348–55.
139. Poot M, Kavanagh TJ, Kang HC, Haugland RP, and Rabinovic PS. Flow cytometric analysis of cell cycle-dependent changes in cell thiol level by combining a new laser dye with hoechst 333421. *Cytometry* 1991; 12: 184-187.
140. Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, Vresilovic EJ, Hillibrand AS, Vaccaro AR, Shapiro IM. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Towards a Nucleus Pulposus-like Phenotype In Vitro: Implications for Cell-Based Transplantation Therapy. *Spine* 2004; 29: 2627-32.
141. Vandekerckhove J, Deboben A, Nassal M, Wieland T. The phalloidin binding site of F-actin. *Embo J* 1985; 4: 2815–2818.
142. Jahraus A, Egeberg M, Hinner B, Habermann A, Sackman E, et al. ATPdependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 155–170.
143. Belmont LD, Patterson GM, Drubin DG. New actin mutants allow further characterization of the nucleotide binding cleft and drug binding sites. *J Cell Sci* 1999; 112: 1325–1336.
144. Oda T, Namba K, Maeda Y Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by Xray fiber diffraction analysis. *Biophys J* 2005; 88: 2727–2736.
145. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5421– 5426.
146. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for AlamarBlue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 2001; 15: 257–259.
147. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986; 56: 930–933.
148. Kasas S, Gotzos V, Celio MR. Observation of living cells using the atomic force microscope. *Biophys J* 1993; 64: 539–544.
149. Muller DJ, Janovjak H, Lehto T, Kuerschner L, Anderson K. Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM. *Prog Biophys Mol Biol* 2002; 79: 1–43.
150. Samori B, Siligardi G, Quagliariello C, Weisenhorn AL, Vesenka J, Bustamante C. Chirality of DNA supercoiling assigned by scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 90: 3598–3601.
151. Yersin A e Pascal S. Receptor trafficking and AFM. *Eur J Physiol* 2008; 456: 189–198.
152. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland Cement–based materials for Endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. *J Endod* 2008; 34: 39–44.