

Marinella Beccherle
 Ulisse Garbin
 Maria Luisa Tosetti
 Roberto Gerosa
 Gianluca Menegazzi
 Giacomo Cavalleri

Università degli Studi di Verona
 Policlinico Borgoroma
 Dipartimento di Scienze Biomediche
 e Chirurgiche
 Cattedra di Odontoiatria Conservatrice
 Titolare: Prof. Giacomo Cavalleri

Corrispondenza:
 Dr.ssa Marinella Beccherle
 Università degli Studi di Verona
 Clinica Odontoiatrica
 Via delle Menegone - 37134 Verona
 Tel. 045.8074251 - fax 045.8202142

La biocompatibilità *in vitro* di 5 cementi endodontici mediante citofluorimetria a flusso

An *in vitro* study of 5 endodontic cements using a flow cytofluorimeter

RIASSUNTO

Scopo del presente studio era quello di valutare la citotossicità dei cementi endodontici normalmente commercializzati, cercando di mimare *in vitro* quello che verosimilmente crediamo avvenga *in vivo*. La tossicità dei materiali è stata determinata utilizzando due sonde fluorescenti in grado di valutare vitalità e danno cellulare, prima che le alterazioni morfologiche microscopiche diventino evidenti. I materiali sono stati valutati immediatamente dopo la loro preparazione e dopo indurimento. Stratificati su appositi supporti, i materiali sono stati posti a circa 1 mm di distanza da monostrati di fibroblasti gengivali umani e Chinese Hamster Ovary (CHO).

Alcuni cementi, testati appena miscelati, risultavano relativamente più tossici rispetto a quando venivano testati dopo il loro indurimento. Per altri cementi invece, risultava vero il contrario, mentre altri, non mostravano sostanzialmente alcuna variazione nei due stati fisici.

Risultavano sovrapponibili i dati ottenuti con le due linee cellulari utilizzate.

Parole chiave: Citofluorimetria a flusso. Vitalità cellulare.

Materiali endodontici.

Introduction

The biocompatibility of dental cements plays an important role in endodontic treatment, the materials must be physiologically reabsorbable and biocompatible with periapical tissue. Materials that are particularly toxic could cause necrosis of the tissue, which in turn would hinder the healing process by creating a microenvironment which would foster the invasion and proliferation of micro-organisms.

Standard procedure for measuring the level of cytotoxicity accepted by all authors is based on the amount of ^{51}Cr released by the cells. The disadvantages of this technique are the high cost of radioactive materials, the brief half-life of the radium-markers (28 days) and the modest but continual, spontaneous release of radioactivity by the cells. This article describes the method used for measuring any initial damage to cells through the use of specific fluorescent probes. The cells are marked with a probe which is not fluorescent initially (calcein AM), but which becomes brightly fluorescent only where the cells are viable; a second probe propidium iodide penetrates the cells giving off a red fluorescent glow only where the plasmic membrane is damaged.

Our study consisted of comparing 5 different endodontic cements commonly used in root canal treatment for the purpose of assessing their potential for being toxic.

Materials and methods

Preparation of materials

Once the cement (1-2-3-4-5) were prepared and ready, they were smeared on a semi-impermeable membrane (with a 12 μm porosity) spread on the bottom of a Millicell-PCF 12 mm diameter culture dish for sterile cell cultures (Millipore Corp., Bedford, USA).

Cell cultures

The fibroblasts used were taken from human gingival biptic fragments and cultivated in Dulbecco's modified eagle's medium (DME) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Measuring toxicity

Vitality tests were carried out using the calcein AM fluorescent and ethium omodime-ro-1 probes (Molecular Probes, Eugene,

OR, USA). The fluorescence of the cells was measured by using a Coulter Counter Epics XL flow cytofluorimeter (Y06063) (Coulter Corporation). The compenflow™ (C-7301 Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was used to compensate the cytofluorimeter.

Results

In order to assess the level of cytotoxicity of 5 endodontic cements, the various materials were placed directly in contact with a single layer of adherent cells so that the individual components of the cements could establish a balance with each chemical gradient in the culture medium which covered the cells, as shown in figure 1.

The various degrees of fluorescence of the five cements tested are shown in figures 4-5 shows the morphological changes that the cells underwent following an incubation period together with the various cements.

Table I gives the details of the percentage differences in cell vitality for the cells that were incubated with fresh cements for 1, 3, 5 and 6 hours, and with hardened cements for 20 hours. The chart shows that fresh cements numbers 1 and 2 were slightly toxic, even over time, compared to the others; whereas cements 3 and 4 appeared to be the most toxic. Following an analization of the hardened cements, number 4, along with numbers 1 and 5, proved to be the best, whereas numbers 2 and 3 were the most toxic.

Discussion

Being able to measure just how toxic certain substances used in medicine are for cells is surely an essential aspect of research. As is known, many methods for assessing cytotoxicity have been devised and employed in the past, each one with its advantages and disadvantages depending on the technique used and the principle on which its function is based. Obviously, the method described here is not without fault as well; it requires highly specialized technicians familiar with flow cytofluorimetry and a flow cytofluorimeter for research purposes, which would be difficult to find in conventional clinical analyses labs.

ABSTRACT

The main of this study was tested the cytotoxicity of common endodontic cements.

In vitro we simulated cells reactions *in vivo* and we evaluated, using two probes fluorescent, vitality and cell damage, before microscopic cells changes were evident.

Materials were tested during preparation and after hardening on human gingival fibroblasts and CHO.

Some cements were found more citotoxic during hardening other after, in a third group no differences were found.

No differences in the two types of cells.

Beccherle M, Garbin U, Tosetti ML, Gerosa R, Menegazzi G, Cavalleri G. La biocompatibilità *in vitro* di 5 cementi endodontici mediante citofluorimetria a flusso. *G It Endo* 2000; 4: 203-208

It is worth remembering, however, that the possibility of accurately identifying damaged or dead cells by using a nuclear, fluorescent dye (propidium iodide) capable of bonding specifically with chromatin, and remaining excluded from the cell as long as the plasmic membrane remains intact, makes this method a highly sensitive one, and a test which can be carried out in a very short time.

Key words: Flow cytometry. Cell vitality. Endodontic materials.

INTRODUZIONE

La biocompatibilità dei cementi gioca un ruolo importante nel trattamento endodontico. La fuoriuscita dall'apice radicolare di questi materiali da riempimento, risulta essere il maggior effetto indesiderato di questo tipo di terapia (1). I materiali dovrebbero essere fisiologicamente riassorbibili ed essere biocompatibili con il tessuto periapicale. L'eccesso di materiali endodontici oltre l'apice, agiscono come corpi estranei sul tessuto connettivo dell'area periapicale. Il tessuto connettivo tende ad assorbire o eliminare l'eccesso di pasta, oppure cercherà di isolarlo con una capsula di tessuto fibroso (3 → 14). Materiali particolarmente tossici potrebbero necrotizzare il tessuto ed impedire il risanamento, creando in qualche modo, un microambiente favorevole all'invasione e crescita di microrganismi.

Nella odierna pratica endodontica, vengono utilizzati in associazione alla guttaperca, differenti cementi endodontici, riferiti dalle case produttrici, atossici. La valutazione della loro citotossicità è stata largamente studiata nel corso di questi ultimi decenni da numerosi autori (3-6) dimostrando con studi *in vivo* ed *in vitro*, che numerosi prodotti commerciali comunemente utilizzati, erano oggettivamente molto citotossici.

La procedura standard di riferimento per la quantificazione della citotossicità riconosciuta da tutti gli autori, si basa sul rilascio del ^{51}Cr dalle cellule. Questa procedura richiede un pre-caricamento cellulare con ^{51}Cr , e successivamente l'incubazione con le

sostanze da testare. La determinazione del cromo marcato nel medium di coltura fornisce una misura indiretta delle cellule danneggiate (morte) ed è direttamente proporzionale alla quantità di radiomarcato rilevato. Svantaggi di questa tecnica sono l'elevato costo del materiale radioattivo, la breve emivita del radiomarcato (28 giorni) e il continuo, anche se modesto, rilascio spontaneo del radioattivo dalle cellule.

Altri metodi utilizzati quantificano la citotossicità determinando la [3H]timidina incorporata, fluorescenza (BCEF, H33342) o enzimi cellulari rilasciati nel medium di coltura (N-acetil-β-esosaminidasi o LDH) (7-10). Qui viene descritto un metodo per quantificare eventuali danni cellulari iniziali mediante specifiche sonde fluorescenti, rilevate in citofluorimetria a flusso o in microscopia a fluorescenza (dati non pubblicati). Le cellule erano marcate con una sonda inizialmente non fluorescente (calceina AM), che diventava intensamente fluorescente solo nelle cellule vitali, mentre una seconda sonda (ioduro di propidio) penetrava nelle cellule producendo una intensa fluorescenza rossa, solo quando la membrana plasmatica era danneggiata.

In questo lavoro, sono stati messi a confronto cinque cementi endodontici commerciali reperiti in modo casuale, normalmente utilizzati nel trattamento endodontico, allo scopo di determinare quale era la loro potenziale citotossicità dopo esposizione diretta dei materiali sulle cellule subito dopo la loro preparazione e dopo il loro indurimento.

MATERIALI E METODI

PREPARAZIONE DEI MATERIALI

I cementi da testare (1 - 2 - 3 - 4 - 5) sono stati preparati in accordo con le istruzioni delle rispettive case produttrici.

I cementi appena preparati venivano distesi su una membrana semi-impermeabile (porosità 12 µm), tesa sul fondo di inserti per colture cellulari sterili Millicell-PCF (Millipore Corp., Bedford, U.S.A.) di 12 mm di diametro.

Per i test che utilizzavano materiale indurito, i cementi dopo opportuno tempo di solidificazione sugli inserti (4 giorni a 25°C, al buio), venivano sterilizzati per 48 hr a 37°C con ossido di etilene. aereati per 72 hr (completa rimozione dei residui gassosi) e successivamente messi ad incubare con le cellule in termostato a 37°C, 100% umidità, 5% CO₂ per 22 ore.

Per i test invece che utilizzano materiali non induriti, i cementi appena preparati erano trasferiti negli inserti e prontamente incubati con le colture cellulari a 37°C, 100% umidità, 5% CO₂ per 1.5 - 3 e 6 ore.

Alla fine dell'incubazione, gli inserti erano rimossi dai pozzetti e le cellule erano lavate 3 volte con tampone fosfato salino (PBS), distaccate con 0.01% di tripsina/EDTA e raccolte in tubi da centrifuga contenente 1 ml di DME-FBS al 2% e centrifugate a 4°C a 500 g. Le cellule erano lavate due volte con PBS prima di essere risospese con la soluzione contenente i reattivi fluorescenti.

COLTURE CELLULARI

I fibroblasti derivano da frammenti biotipici gengivali umani ed erano coltivati in Dulbecco's modified eagle's medium (DME) (Sigma, St. Louis, USA) contenente 1 gr/L di glucosio, 0,11 gr/L ac. piruvico, 3,7 gr/L NaHCO₃, 25 mM HEPES, siero fetale di bovino (FBS) al 10% (Seromed, Berlino, Germania), 2 mM glutamina (Seromed, Berlino, Germania), 30 µg/ml fattore di crescita per fibroblasti (Sigma, St. Louis, USA), 100 U/ml penicillina (Sigma, St. Louis, USA), 100 µg/ml di streptomycin (Sigma, St. Louis, USA) e 5.6 µg/ml di amfotericina (Sigma, St. Louis, USA). Le fiasche da 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, USA) contenenti le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera composta per il 95% da aria e per il 5% da CO₂, e in presenza di umidità relativa al 100%. Il medium era sostituito ogni 3 giorni. Raggiunta la confluenza cellulare, i fibroblasti erano trasferiti in piastre da 24 pozzetti (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, USA) ad una concentrazione di 60000 cellule/ml/pozzetto (area 2 cm²) ed utilizzate dopo 2 giorni. Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule al passaggio 2-4.

Sono state utilizzate anche cellule immortalizzate CHO che venivano coltivate in minimum essential medium eagle (MEM) (Sigma, St. Louis, USA), 25 mM HEPES, FBS al 10%, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml di streptomina e 5.6 µg/ml di amfotericina.

Raggiunta la confluenza, le cellule ovariche erano trasferite in piastre da 24 pozzetti ad una concentrazione di 70000 cellule/ml/pozzetto ed utilizzate per l'esperimento dopo 2 giorni.

DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ

I test di vitalità sono stati effettuati con le sonde fluorescenti calceina AM ed ethidium omodimero-1 (Molecular Probes, Eugene, U.S.A.). I pellet cellulari ottenuti dopo i lavaggi in PBS erano risospesi in 300 µl di PBS contenente 10 µM ethidium omodimero-1, 0.4 µM calceina AM ed incubati a 25°C per 10 minuti prima della determinazione della fluorescenza.

La fluorescenza cellulare veniva valutata utilizzando un citofluorimetro a flusso Coulter Counter Epics XL (YO6063) (Coulter Corporation) e derivava dalla media di 10000 - 7000 cellule. Per la compensazione citofluorimetrica è stato utilizzato compenflow™ (C-7301 Molecular Probes, Eugene, U.S.A.), che utilizzava microsfeere di 6.0 µm di fluorescein-like polystyrene (emissione massima 515 nm), R-phycoerthrin-like polystyrene (emissione massima 575 nm) e microsfeere di polystyrene di controllo.

RISULTATI

Per valutare la citotossicità dei cementi, in questa sperimentazione, i materiali da testare non sono stati messi a contatto con soluzioni di PBS e quest'ultime (contenente gli elementi citotossici rilasciati dai cementi) diluite nel medium di coltura, ma i vari materiali sono stati posti direttamente di fronte a un monostato di cellule aderenti, permettendo ai singoli componenti dei materiali, di equilibrarsi per gradiente chimico, nel me-

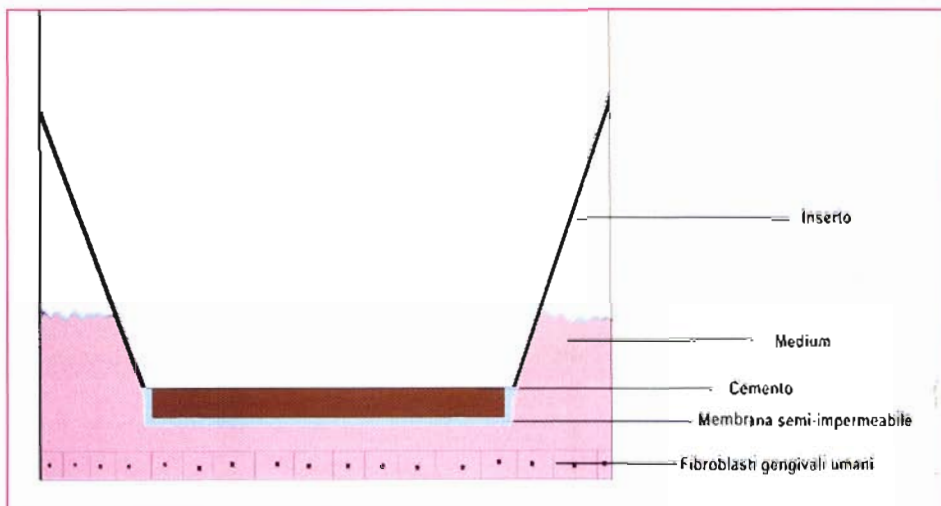
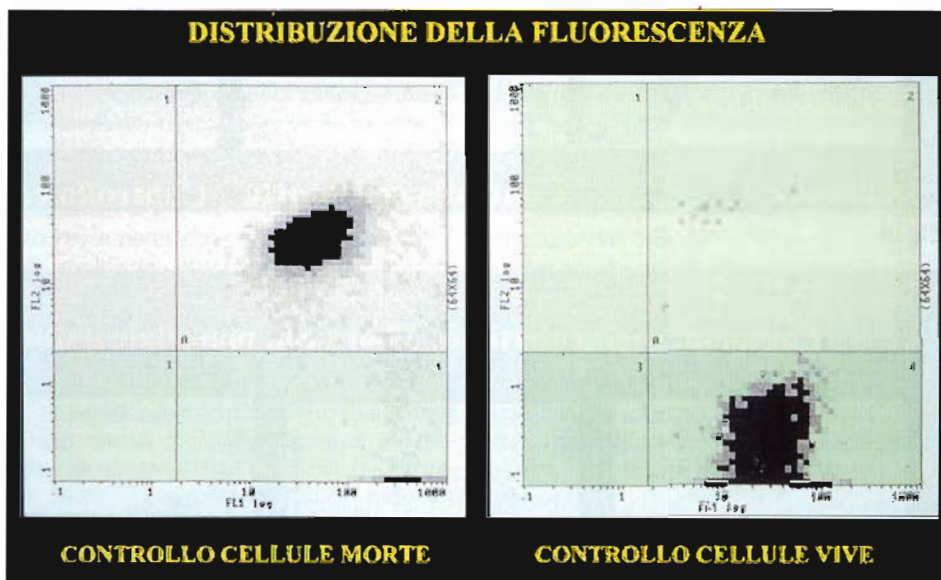
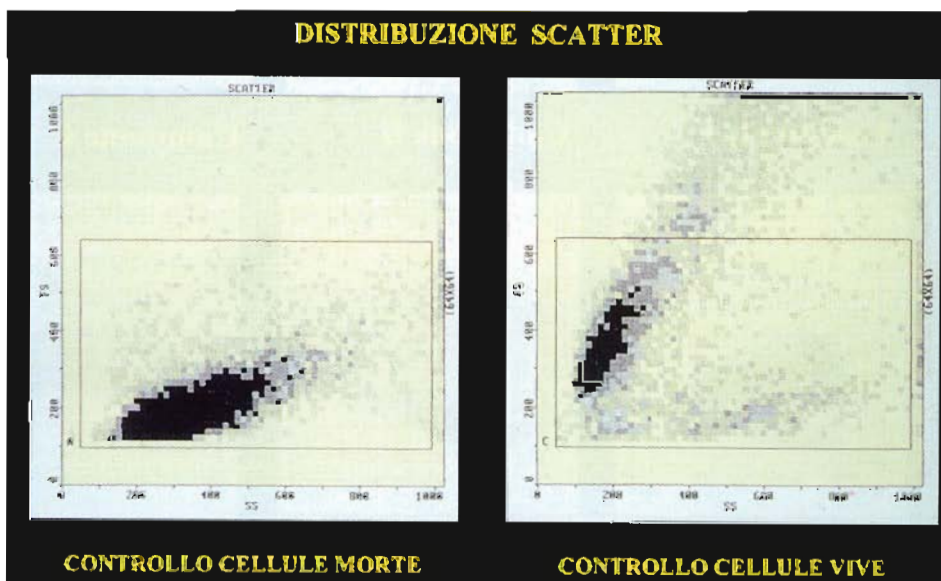


Fig. 1



Figg. 2a-b



Figg. 3a-b

dium di coltura che bagna le cellule (Martine G.) come illustrato nella figura 1. La figura 2b invece illustra una distribuzione morfologica scatter citofluorimetrica di un controllo cellule vitali (vive), mentre la

figura 2a illustra una distribuzione scatter citofluorimetrica di un controllo cellule danneggiate-morte.

La fluorescenza di emissione delle due sonde veniva letta in FL1 (525 nm) e in FL2

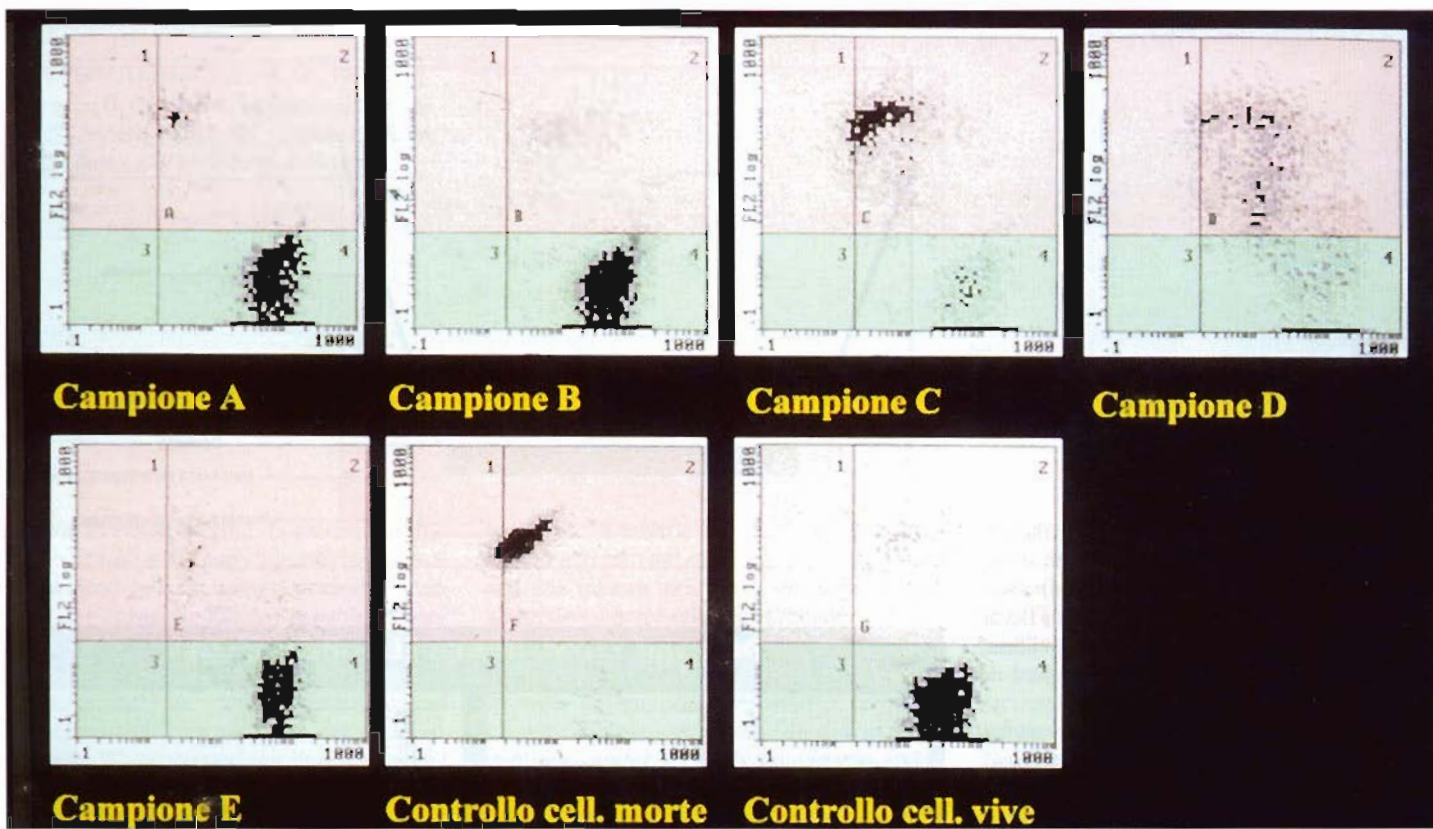


Fig. 4

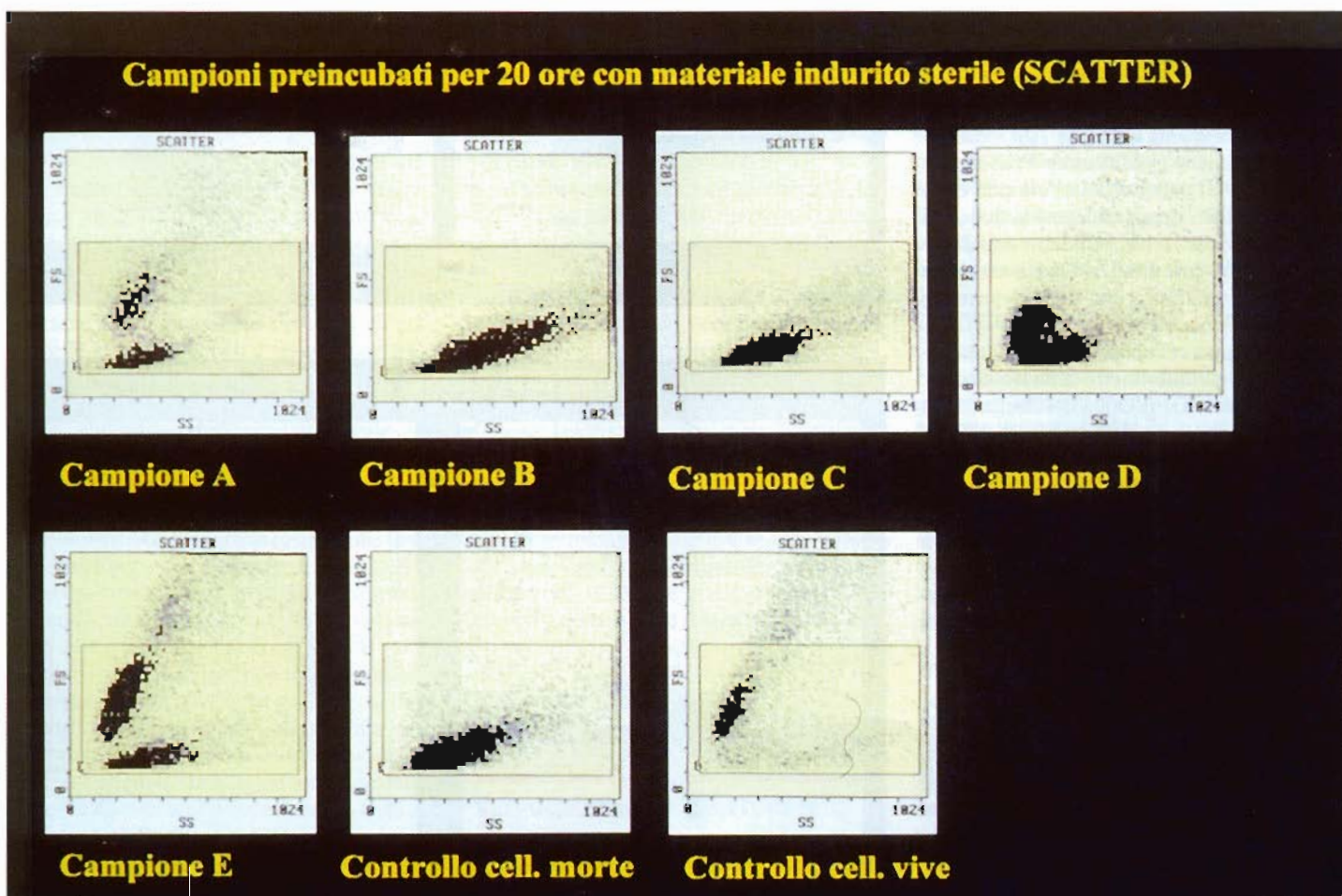


Fig. 5

(575 nm). La figura 3b mostra il rapporto delle fluorescenze (FL1/FL2) emesse da un controllo cellule vive, mentre la figura 3a illustra il rapporto fluorescenza di un controllo cellule morte.

Il controllo cellule morte veniva preparato incubando cellule vive con 0.1% digitonina per 15 minuti o 70% metanolo per 30 minuti. I rapporti di fluorescenza dei 5 cementi testati vengono illustrati nella figura 4. Dai

grafici appare evidente che la fluorescenza FL2 (etidum bromuro) contenuta nelle cellule che sono state incubate con i cementi 2 e 3 è notevolmente più alta rispetto al controllo e agli altri cementi, indicando grave

danno cellulare.

La figura 5 mostra i relativi scatter indicando il cambio morfologico subito da queste cellule dopo incubazione con i vari cementi. Il citofluorimetro a flusso permette di rilevare le cellule vive e le cellule danneggiate-morte anche senza l'ausilio delle due sonde fluorescenti, ma semplicemente osservando la sola morfologia cellulare. Ad esempio, osservando gli scatter si evidenziava immediatamente l'entità del danno subito dalle cellule che sono state incubate con i cementi numero 2 e 3.

La tabella 1 quantifica in dettaglio le differenze percentuali della vitalità cellulare rispetto ai controlli delle cellule che sono state incubate con i cementi freschi per 1,5, 3 e 6 ore e con i cementi induriti per 20 ore.

Dalla tabella appare che il cemento fresco 2 e 1 erano relativamente poco citotossici anche nel tempo rispetto agli altri cementi (95.5% e 91.2% cellule vive residue dopo incubazione), mentre i più citotossici apparivano essere i cementi 4 e 3 (32.9% e 45.3% cellule vive).

Quando sono stati analizzati i cementi induriti, il cemento 4 risultava essere assieme al cemento 5 e 1, i migliori rispetto controllo (74.2, 69.5 e 66.2% rispettivamente), mentre i più citotossici apparivano il 2 e 3 (1.5 e 2.8% cellule vive residue).

DISCUSSIONE

La capacità di poter quantificare correttamente la citotossicità delle sostanze utilizzate in medicina, rappresenta sicuramente uno strumento essenziale per la ricerca. Il frequente e vasto utilizzo dei materiali endodontici, ci impone di conoscere e valutare in modo oggettivo e preciso, quale sia il loro reale potenziale citotossico. Come è noto, molti sono stati i metodi sviluppati e usati in passato per valutare la citotossicità. Ciascun metodo, presenta vantaggi e svantaggi, che dipendono dalla tecnica utilizzata e dal principio su cui è basato il loro principio di funzionamento. Il test che viene ancora oggi considerato "gold standard" è il metodo che utilizza il rilascio di ⁵¹Cr (1) (Brunner, 1968), ma la corta emivita del radioisotopo, il potenziale pericolo di inquinamento ambientale e per la salute umana, nonché il rilascio spontaneo del radioisotopo, limitano il suo utilizzo.

Ovviamente nemmeno il metodo descritto in questo lavoro non è immune da critiche, in quanto necessita di personale tecnico specializzato in citofluorimetria a flusso e di un citofluorimetro a flusso per ricerca, difficilmente reperibile nei convenzionali labo-

ratori di analisi clinica.

Il nostro studio è basato sullo sviluppo del modello ideato da Meryon and Brook nel 1990 (2-4) e l'originalità di esso risiede nel fatto che il materiale da testare è quasi a contatto con le cellule di fibroblasti, separato da una membrana semipermeabile con pori di 0.22 µm. Ciò permetteva di testare sia materiali freschi non induriti, che a detta di molti è maggiormente rappresentativo di quello che succede *in vivo* nelle fasi iniziali, che materiali induriti.

Come appare dai risultati, con queste condizioni sperimentali, è stato evidenziato che alcuni materiali erano molto citotossici durante la fase di indurimento rispetto ai test eseguiti dopo indurimento. Per altri materiali invece, appariva vero il contrario, mentre alcuni di loro risultarono sempre relativamente atossici e altri relativamente sempre tossici.

La possibilità di determinare in maniera precisa le cellule danneggiate o morte, utilizzando un colorante nucleare fluorescente (propidio ioduro), in grado di legarsi specificamente con la cromatina, ed essere escluso dalla cellula fino a che la membrana plasmatica rimane integra, fornisce a questo metodo, grande sensibilità e permette di eseguire i test in brevissimo tempo.

PERCENTUALI CELLULE VIVE E MORTE DEI MATERIALI ENDODONTICI								
CEMENTO FRESCO							CEMENTO INDURITO	
Incubazione		1,5 ore		3 ore		6 ore		20 ore
Controllo	Cell. vive (%)	Cell. morte (%)	Cell. vive (%)	Cell. morte (%)	Cell. vive (%)	Cell. morte (%)	Cell. vive (%)	Cell. morte (%)
Cellule Vive	97,8	2,2	97,8	2,2	97,8	2,2	86	13,2
Cellule Morte	2,4	97,6	2,4	97,6	2,4	97,6	9,6	90,3
materiali								
cemento A	91,2	8,8	88	12	91,9	8,1	66,2	33,8
cemento B	95,5	4,5	96,4	3,6	94,1	5,9	1,5	98,3
cemento C	45,3	54,5	20,7	79,3	7,3	92,7	2,8	97,2
cemento D	32,9	67,1	18,2	81,8	5,8	94,2	74,2	25,7
cemento E	71,6	28,4	55,6	44,4	24,5	75,5	69,5	30,5
Percentuali media di tre esperimenti								

Tab. 1

BIBLIOGRAFIA

1. Biggs JT, Kaminski JE, Osetek EM. Rat macrophage to implanted sealer cements. *J Endodon* 1985; 1: 30-36.
2. Muruzabal M, Erasquin J, Devoto F-CH. A study of periapical overfilling in root canal treatment in the molar of rat. *Arch Oral Biol* 1996; 11: 373-83.
3. Gerosa R, Borin M, Menegazzi GL, Faccioni F, Cavalleri G. Un metodo di valutazione della citotossicità relativa dei materiali da otturazione canalare su colture di fibroblasti umani. *G It Endo* 1993; 7, 3: 128-32.
4. Rodriguez H, Spangberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials 9. Effect of zinc-oxide eugenol cements on hela cells *in vitro*. *Estomatol Cult* 1975; 9 (2): 191-4.
5. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M Jr. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 1968; 8 (2): 443-67.
6. Safavi KE, Spangberg LS, Costa NS Jr, Sapounas G. An *in vitro* method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. *J Endodon* 1989; 15 (10): 484-6.
7. Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effect of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 36 (6): 856-71.
8. Keilholz U, Dummer R, Welters H, Brado G, Galm F, Matheiwetz P, Hunstein W. A modified cytotoxicity assay with high sensitivity. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50 (8): 879-84.
9. Korzenjewski C, Calewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983; 25, 64 (3): 313-20.
10. Blomberg K, Graberg C, Hemmila I, Loygren T. Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity II. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence significance specificity of the method. *J Immunol Methods* 1986; 92 (1): 117-23.
11. Guigard M, Pellen-Mussi P, Le Goff A, Vulcain JM, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of tree endodontic materials. *J Endodon* 1999; 25 (6): 419-23.
12. Brunner KT, Manuel J, Cerottini JC, Chapuis B. Qualitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51Cr-labeled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968; 14: 181.
13. Meyon SD, Brook AM. *In vitro* comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. *Int J Endod* 1990; 23: 203-10.