

Citotossicità *in vitro* di un nuovo materiale resinoso plastico per otturazione canalare

Traduzione dell'articolo:

In vitro cytotoxicity of a soft resin core filling material for canal obturation

RIASSUNTO

Scopo: un nuovo sistema di otturazione canalare (RealSeal, SybronEndo, Orange CA) è stato di recente commercializzato per incrementare il successo endodontico. Il Real Seal (RS) è un materiale resinoso che assomiglia e si comporta analogamente alla guttaperca. Il presente studio si è posto l'obiettivo di comparare la tossicità *in vitro* dei coni RS con quella di coni di guttaperca (GP) tradizionali (Roeko, Langenau, Germany), utilizzando un test NRU.

Metodologia: fibroblasti di topo 3T3 sono stati selezionati, coltivati e posti poi a contatto con diluzioni dei coni RS e GP. Dopo 24h d'incubazione, la mortalità cellulare è stata analizzata con test NRU (assorbimento di rosso neutro) che misura la permeabilità delle membrane cellulari. I dati sono stati raccolti ed analizzati statisticamente (t-Student test).

Risultati: i valori medi in percentuale di mortalità cellulare sono stati di 26,584 per RS (SD 3,295) e 25,101 per GP (SD 3,060). Entrambi i materiali testati hanno mostrato una minima tossicità cellulare, senza però differenze statisticamente significative fra loro.

Conclusioni: pur con le limitazioni inerenti a questo tipo di studi sperimentali, i due materiali testati (RS e GP) hanno mostrato tossicità simile. Dato che in letteratura la biocompatibilità della guttaperca è considerata ottimale, i coni RS che hanno analoga minima tossicità, sono da considerarsi altrettanto sicuri e da raccomandare per l'uso clinico.

Parole chiave:

Guttaperca, biocompatibilità, otturazione endodontica.

INTRODUZIONE

Molti materiali sono stati proposti negli anni per un'otturazione canalare di successo. Anche se non è forse il materiale ideale come *core* solido, la guttaperca è sicuramente quello di prima scelta (2), in quanto mostra una minima tossicità, con scarse reazioni tissutali (13,15) e soddisfa la maggioranza dei requisiti descritti da Grossman (4) per un materiale d'otturazione canalare ideale. È stato riportato, ed è risaputo, che la guttaperca è il materiale più usato proprio per la sua bassa tossicità (9). Infatti nei casi di moderata estrusione nei tessuti periradicolari, viene clinicamente ben tollerata a patto che il canale sia ben deterso e sigillato (3).

Tra gli svantaggi della guttaperca la mancanza di adesione alle pareti canalari ed ai cementi endodontici è forse il più importante. Non si può ottenere un sigillo ermetico senza cementi in quanto la guttaperca non aderisce da sola alle pareti dentinali. Un cemento endodontico dovrebbe idealmente avere una forte adesione sia alla guttaperca che alle pareti canalari. Questa adesione è auspicabile anche quando si preparano i perni per non dislocare il materiale e perdere il sigillo apicale. Purtroppo studi recenti hanno evidenziato come l'adesione fra guttaperca e cementi sia scarsa (6). Alcuni cementi hanno infatti mostrato una forza di adesione alla

gutta (circa 20 Mpa) ben inferiore a quella nei confronti della dentina (0,30-80 Mpa). Ne deriva che le tecniche ed i materiali oggi in uso routinario non sono in grado di fornire un sigillo ermetico ottimale. Tutti i canali otturati tendono a infiltrarsi nel tempo (5). Torabinejad et al. (14) hanno mostrato come quando poi sopraggiungono batteri, questi possono raggiungere l'apice entro 30 giorni.

Di recente, visto l'aumento del numero dei trattamenti endodontici effettuati sia da specialisti che da non specialisti, vi è stato un rinnovato interesse nel proporre nuovi materiali e tecniche per l'otturazione canalare. La ricerca ha posto l'attenzione sulle proprietà di nuovi materiali di garantire un miglior sigillo fra loro e con le pareti canalari, creando un sigillo ermetico impenetrabile a fluidi e a batteri. Tra queste idee, i materiali compositi a base resinosa sembrano i più promettenti, per le loro caratteristiche di adesione già validate in ambito restaurativo.

Sulla base di queste premesse un nuovo sistema di otturazione canalare (RealSeal, SybronEndo, Orange CA) è stato di recente commercializzato per incrementare il successo endodontico. Il sistema RealSeal (RS) si può utilizzare con le tecniche di otturazione comunemente usate, sostituendo solamente i tradizionali cementi e guttaperca con analoghi materiali a base di RS. I coni RS sono infatti composti da resine termoplastiche che sono simili come forma e come proprietà a quelli di guttaperca. Le proprietà termoplastiche sono simili, con temperature di rammollimento inferiori per il RS, che è, in analogia con la gutta, un materiale radio-

paco, rimovibile dai canali con la strumentazione e con i solventi d'uso abituale. Essendo a base resinosa il RS è in grado di ottenere con i tessuti dentali un vero legame adesivo, previo condizionamento dei tessuti con un *primer*. Questi si lega alle pareti, il cemento RS si lega al *primer* e il materiale d'otturazione RS si lega al cemento RS. Secondo il fabbricante, questo permette una intima adesione (monoblocco) fra materiali e pareti canalari, in grado di prevenire microinfiltrazioni e rafforzare la radice. Il dato è confermato da alcune ricerche preliminari che hanno mostrato un sigillo con il RS migliore che con guttaperca e cementi tradizionali (10). Essendo un materiale di recente introduzione, poche ricerche sulle proprietà biologiche dei coni RS sono state pubblicate. Ovviamente anche la biocompatibilità è una proprietà da testare per un nuovo materiale che si propone clinicamente come migliorativo rispetto a quelli esistenti. Pertanto il presente studio si è posto l'obiettivo di comparare la tossicità *in vitro* dei coni RS con quella di coni di guttaperca (GP) tradizionali.

MATERIALI E METODI

I seguenti coni standardizzati di conicità 04 e taglia 15 sono stati scelti e utilizzati per valutare i loro effetti sulla mortalità cellulare:

1 RS = RealSeal (SybronEndo, Orange CA). Composizione dei coni: polimeri di poliesteri, con riempitivi e radiopacizzanti in una matrice resinosa termoplastica.

2 GP = Coni a conicità aumentata (Roeko, Langenau, Germany). Composizione dei coni: approx 20% guttaperca, 50% ossido di zinco e cere, coloranti, antiossidanti e sali metallici.

Gli ultimi tre millimetri dalla punta di ciascun cono sono stati tagliati e pesati per avere la stessa quantità di materiale da mettere a contatto con le cellule, previa sterilizzazione degli stessi con UV. Ciascun campione è stato immerso in DMEM (0.4 mL) e lasciato *in situ* per 24h a 37°C; contemporaneamente in ogni pozzetto sono stati seminati fibroblasti di topo 3T3-Swiss (10.000), per

un totale di 96 pozzetti e coltivati in un monostrato sottoconfluente per 24h. Dopo questo periodo, estratti di DMEM ottenuti da ciascun campione sono stati aggiunti al monostrato e la mortalità delle cellule incubate per 24h è stata analizzata con test NRU.

Una soluzione acquosa allo 0,4% di rosso neutro è stata aggiunta ad ogni pozzetto con un rapporto 1:80 per ottenere una concentrazione finale di rosso neutro pari a 50 µg/mL. Dopo incubazione per 4h a 37°C il supernatante è stato rimosso e il rosso neutro intracellulare è stato solubilizzato con 200 µL di soluzione acquosa di etanolo 50% con 1% di acido acetico. L'assorbanza a 540 nm di ciascuno dei 96 campioni è stata determinata con un fotometro automatico (Packard Spectracount™, Packard BioScience Company, Meriden USA).

La citotossicità per ciascun test, eseguita in sestuplicato, è stata calcolata con la seguente formula:

$$\% \text{ mortalità cellulare} = \frac{\text{Valore Controllo} - \text{Valore Campione}}{\text{Valore Controllo}} \times 100$$

L'analisi statistica eseguita è la seguente: ciascun dato è la media di tre test, usando tre campioni di materiale per ciascun test. I risultati nelle tabelle sono espressi come media e deviazione standard, ed i gruppi sono stati paragonati fra loro con test t-Student, considerando significativo il valore $p < 0.05$.

RISULTATI

I risultati sono mostrati nelle Tabelle 1-2, che comparano la differente tossicità *in vitro* dei due materiali; la più alta percentuale di mortalità cellulare indica una maggiore tossicità dei casi. I valori medi in percentuale di mortalità cellulare sono stati di 26,584 per RS (SD 3,295) e 25,101 per GP (SD 3,060). Entrambi i materiali testati hanno mostrato una minima tossicità cellulare, senza però differenze statisticamente significative fra loro (t-Student).

DISCUSSIONE

Guttaperca e cementi sono storicamente i materiali di scelta per una valida otturazione tridimensionale dello spazio endodontico (8), al fine di impedire ricontaminazione dello spazio endodontico sia dal cavo orale che dai tessuti periradicolari. La guttaperca è sempre stato il materiale semisolido d'elezione anche per le sue valide proprietà biologiche. Se vogliamo migliorare la qualità dei nostri trattamenti endodontici, dobbiamo utilizzare nuovi materiali che migliorino il sigillo fornito dalla guttaperca senza però perdere le ottimali caratteristiche di biocompatibilità della stessa. Sulla base di tali premesse è stato eseguito il presente studio, che ha dimostrato come entrambi i materiali testati (GP e RS) hanno mostrato una minima tossicità cellulare, senza differenze sta-

tisticamente significative fra loro. Vista la biocompatibilità della guttaperca, questi dati preliminari sembrano supportare l'uso clinico del RS che ha mostrato proprietà biologiche similari, anche se tali riscontri, pur incoraggianti, dovranno essere confermati da studi *in vivo* e studi clinici di controllo.

La biocompatibilità di guttaperca e cementi è stata, negli anni, oggetto di numerosissimi studi in letteratura. Pascon e Spanberg (9) hanno valutato la tossicità di diversi coni di guttaperca presenti nel commercio con un test di rilascio di cromo radioattivo, comparando con i coni di 14 case, tre tipi di coni sperimentali, in aggiunta a guttaperca naturale ossido di zinco e solfato di bario, cioè le sostanze che compongono per lo più i coni in commercio. I risultati hanno mostrato come la guttaperca naturale ed il solfato di bario non sono tossici, mentre l'ossido di zinco e gli ioni zinco lo sono. I coni testati evidenziarono una buona biocompatibilità a breve termine (24 ore), ma una certa tossicità a medio-lungo termine, da attribuirsi al rilascio

di ioni zinco nei fluidi.

Tali risultati sono stati confermati da Szep et al. (12), che hanno testato la citotossicità di due marche di coni di guttaperca medicate e di quattro non medicate, fra i quali vi è anche la casa produttrice testata nel presente lavoro. I risultati hanno mostrato come, nei confronti dei coni non medicati, non vi fossero differenze significative nel caso di coni di guttaperca medicati contenenti idrossido di calcio, mentre vi erano in quelli contenenti clorexidina, ma soprattutto tutti i coni mostravano un certo grado di tossicità. Tale dato è peraltro confermato dal presente studio.

Zmener et al. (15) hanno valutato gli effetti di due formulazioni diverse di guttaperca e di un materiale d'otturazione a base di ossido di zinco-eugenolo e balsamo del Canada su cellule umane monocitarie e linfocitarie. I risultati evidenziarono come i coni tradizionali e la guttaperca Ultrafil mostravano minimi o assenti effetti tossici, mentre l'Endoseal produceva marcate reazioni inibitorie. La metodologia di tali test ed i risultati suffragavano poi l'ipotesi che tali test di biocompatibilità siano di indubbia utilità per uno screening preliminare di

nuovi materiali per otturazione endodontica.

Sjogren et al. (11) hanno valutato la biocompatibilità *in vivo* della guttaperca mediante impianto sottocutaneo nel ratto in tubetti di Teflon. La guttaperca è stata testata in tre forme: (I) pezzetti di cono; (II) particelle fini dopo triturazione dei coni; (III) particelle dopo scioglimento parziale in cloroformio. I risultati hanno evidenziato come si potesse avere due risposte ben distinte da parte dell'organismo ospite. I pezzetti di guttaperca venivano incapsulati e circondati da tessuto senza segni di infiammazione, mentre le particelle fini evocavano una risposta infiammatoria intensa, localizzata, con presenza di macrofagi e cellule giganti multinucleate. Quest'ultima risposta flogistica era analoga a quella delle particelle disciolte in cloroformio, laddove si distinguevano anche residui cellulari derivanti da una probabile tossicità del cloroformio. In sintesi, si affermava che dimensioni e caratteristiche di superficie della guttaperca potevano dare diverse reazioni tissutali, e che l'accumulo di macrofagi intorno alle particelle di guttaperca potesse essere un fattore prognostico sfavo-

revole, in grado di ostacolare la guarigione, nei casi di fuoriuscita accidentale oltre apice del materiale.

Tutti gli studi sopramenzionati evidenziano come lo studio della biocompatibilità di materiali endodontici sia piuttosto complesso, in quanto molti fattori possono influire sulla risposta biologica ai materiali. Pertanto i dati del presente studio vanno intesi solo come un'analisi preliminare di un nuovo prodotto che dovrà essere seguita da studi più approfonditi nel tempo. Ciononostante i risultati preliminari sono incoraggianti, in quanto i due materiali testati (RS e GP) hanno mostrato tossicità simile, senza differenze statisticamente significative. Dato che in letteratura la biocompatibilità della guttaperca è considerata come una caratteristica estremamente favorevole, anche i coni RS che hanno analoga minima tossicità, sono da considerarsi altrettanto ben tollerati dall'organismo, per cui si possono utilizzare clinicamente con la stessa sicurezza di quelli di guttaperca.

*Traduzione a cura
del Dott. Cristiano Fabiani*