

Giuseppina Nocca<sup>1</sup>  
Alessandro Lupi<sup>2</sup>  
Valentina Vincenzi<sup>3</sup>  
Giampiero Bolognini<sup>3</sup>  
Giovanna Aboulkhair<sup>3</sup>  
Giuseppe Floridi<sup>3</sup>

Università Cattolica del S. Cuore, Roma  
Facoltà di Medicina  
<sup>1</sup> Istituto di Biochimica e Biochimica  
Clinica  
C.N.R., Sezione di Roma  
<sup>2</sup> Istituto di Chimica del Riconoscimento  
Molecolare  
Università degli Studi di Roma  
"La Sapienza"  
Facoltà di Medicina  
<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze  
Odontostomatologiche

**Corrispondenza:**  
Dott. Giuseppina Nocca  
Istituto di Biochimica e Biochimica  
Clinica, Facoltà di Medicina  
Università Cattolica del S. Cuore, Roma  
L.go Francesco Vito, 1- 00168 Roma  
Tel.: +39 6 3057612 Fax+39 6 3053598  
E-mail: giuseppina.nocca@icrm.cnr.it

Pervenuto in Redazione il 7 febbraio 2007  
Accettato per la pubblicazione l'8 maggio 2007

## Tossicità *in vitro* di un irrigante sperimentale per uso endodontico

*In vitro* toxicity of an experimental endodontic irrigant

### RIASSUNTO

**Scopo:** per potenziare l'azione detergente e disinfettante dell'ipoclorito di sodio (NaOCl) di recente è stato proposto l'abbinamento di enzimi proteolitici, che dovrebbero favorire la lisi tissutale; ciò grazie all'uso di enzimi "compatibili", cioè in grado di esercitare la loro azione anche in presenza di ipoclorito. Un prodotto sperimentale è stato messo a punto dalla ditta Giovanni Ognà & figli S.p.A. (Milano, Italia), sul quale sono state effettuate prove tossicologiche con colture cellulari per determinare in via preliminare il grado di tossicità.

**Metodologia:** sono state testate due soluzioni di ipoclorito con enzima e due confezioni di ipoclorito di sodio entrambe a diverse concentrazioni (5% e 3%) prodotte dalla stessa ditta onde confrontare la tossicità del prodotto puro e di quello con enzima, mediante il saggio colorimetrico MTT (n=4). Questo saggio è particolarmente indicato per valutare l'effetto biologico di sostanze idrosolubili. Vista l'elevata citotossicità dell'ipoclorito di sodio è stato necessario diluire preventivamente i campioni a differenti concentrazioni. La vitalità cellulare è stata determinata - dopo 5 minuti di incubazione - a contatto con le soluzioni diluite tramite il saggio MTT. I dati in sestuplicato sono stati raccolti ed analizzati statisticamente.

**Risultati:** i risultati evidenziano come

l'ipoclorito risulta essere citotossico in tutte le soluzioni esaminate, sia al 3% che al 5%, con o senza enzima. Vi è però una differenza significativa per quanto concerne la presenza dell'enzima: essa riduce significativamente tale effetto a valori medi di tossicità in tutte le diluzioni eseguite, tranne una (2 µL).

**Conclusioni:** i dati emersi da questo studio servono ad evidenziare che l'aggiunta di enzima non sembra comportare effetti più sfavorevoli rispetto all'ipoclorito puro per quanto concerne le proprietà biologiche, anzi forse sembrano migliori, anche se l'utilizzo clinico del prodotto sperimentale non si può considerare scevro da complicazioni.

**Parole chiave:**

**Ipoclorito di sodio, enzimi, irrigazione canalare.**

### ABSTRACT

**Aim:** in order to increase the disinfecting and cleansing efficacy of sodium hypochlorite (NaOCl) the adjunct of proteolytic enzymes has been suggested. The incorporation of such enzymes, which can work even in the presence of NaOCl, is meant to improve tissue dissolving properties of the irrigant. A new experimental irrigant has been developed by Giovanni Ognà & figli S.p.A. (Milano, Italia), and the-

refore toxicity of the new product had to be evaluated before clinical use.

**Methodology:** two different NaOCl irrigating solutions (3 and 5%) made by the same manufacturer, each one with and one without the enzymes, were tested for *in vitro* toxicity using MMT essay (n=4). The test is very reliable to assess toxicity of hydrophilic materials. Since NaOCl is known to be very cytotoxic, various dilutions of the irrigants were tested. Cellular vitality was assessed after 5 minutes of incubation, in contact with the diluted solutions by MMT essay. Data were performed in sestuplicate, collected and statistically analyzed.

**Results:** results show that sodium hypochlorite is toxic at both tested concentrations (3 and 5%), with and without the adjunct of enzymes. However a statistically significant difference was noted in diluted solution with the adjunct of proteolytic enzymes, which were less toxic than pure NaOCl in all dilutions with the exception of one (2 µL).

**Conclusions:** data from the present study support the hypothesis that the adjunct of proteolytic enzymes does not increase toxicity of NaOCl, but is likely to reduce it. However the irrigating solutions still are toxic and should be used carefully in clinical practice.

**Key words:**

**Sodium hypochlorite, enzymes, root canal irrigation.**

## INTRODUZIONE

Per ottenere un buon successo in campo endodontico si deve sempre associare all'alesatura meccanica del sistema dei canali radicolari, eseguita sia con strumenti endodontici manuali e/o rotanti, l'irrigazione endocanalare, al fine di detergere e disinfettare lo spazio endodontico quanto meglio possibile. Le soluzioni irriganti dovrebbero idealmente soddisfare dei precisi requisiti per un corretto uso clinico: essere non tossiche e non irritanti per i tessuti del periapice, avere una attività antibatterica e germicida (1, 2), offrire una lubrificazione del canale radicolare per favorire l'azione degli strumenti endodontici, digerire i tessuti necrotici e i residui proteici eventualmente presenti nel canale, possedere una bassa tensione superficiale per poter raggiungere zone non trattabili con gli strumenti endodontici e infine essere facilmente reperibili e poco costose (3, 4).

Anche se nel corso degli anni diversi materiali da irrigazione canalare sono stati introdotti in commercio al fine di ottenere dei risultati sempre più soddisfacenti (5), l'ipoclorito di sodio (NaOCl) rimane la soluzione più utilizzata, anche se non svolge un'azione di rimozione del fango dentinale, e soprattutto ha una azione antibatterica ben più efficace (anche a minori concentrazioni) di quella di detersione e digestione dei tessuti organici. Ne deriva che è quasi impossibile, specialmente nelle anatomie complesse, eseguire una perfetta detersione dell'endodonto, per cui negli anni si è cercato di potenziare in vari modi l'efficacia clinica dell'ipoclorito (6): riscaldamento, attivazione della soluzione con energia sonora, etc.

Di recente è stato proposto l'abbinamento di enzimi proteolitici, che in linea teorica dovrebbero fornire un aiuto nell'incrementare la detersione favorendo la lisi tissutale; ciò grazie all'uso di enzimi "compatibili" con l'ipoclorito, cioè in grado di esercitare la loro azione anche in presenza di ipoclorito. Un prodotto sperimentale è stato messo a punto dalla ditta Giovanni Ogna & figli S.p.A. (Milano, Italia), innescando

una serie di studi atti a verificarne l'efficacia e la sicurezza clinica.

Giova ricordare che gli irriganti canalari, come tutti i materiali utilizzati in campo odontoiatrico, sono sottoposti alla norma di valutazione biologica dei dispositivi medici UNI EN ISO 10993-1 (7). Tale normativa ha come obiettivo quello di essere un documento di riferimento globale per la selezione di prove che consentano di poter valutare le risposte biologiche in relazione alla sicurezza dei dispositivi e dei materiali medici (8). Secondo la norma sopra indicata, anche se gli irriganti canalari risultano essere dei dispositivi comunicanti con l'esterno ed a esposizione limitata, va comunque valutata la loro potenziale tossicità nei confronti di tessuti biologici.

Sulla base delle premesse sopraindicate, nel presente lavoro di ricerca sono state effettuate prove tossicologiche con colture cellulari per determinare in via preliminare il grado di tossicità dell'irrigante sperimentale.

## MATERIALI E METODI

Sono state ricevute 4 confezioni di un irrigante sperimentale per uso endodontico della ditta Giovanni Ogna & figli S.p.A. (Milano, Italia)

- 2 confezioni di Sodio ipoclorito 5% + Enzima Lotto CP00806 (Scadenza 2008-05)
- 2 confezioni di Sodio ipoclorito 3% + Enzima Lotto CP00906 (Scadenza 2008-05)

Sono state ricevute anche 2 confezioni di ipoclorito di sodio 5% e 3% dalla stessa ditta onde confrontare la tossicità del prodotto puro, cioè senza enzima, attualmente commercializzato per uso endodontico.

### Culture cellulari

- PE/CA-PJ15 OSCC (*Oral Squamous Cell Carcinoma*)

### Reagenti

Tutti i reattivi utilizzati sono di purezza analitica e, ove necessario, le soluzioni sono state preventivamente sterilizzate.

### Mantenimento in coltura della linea cellulare

Le cellule (fornite dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia) sono state fatte crescere in incubatore con atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C in IMEM (*Iscove's Modified Eagle's Medium*) con HEPES (10 mM), glucosio (5.0 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (3.7 g/L), penicillina (100 unità/mL), streptomycin (100 µg/mL) e 10 % Siero Fetales Bovino (FCS).

### Studi di citotossicità

Per studiare la citotossicità indotta dai materiali in esame è stata utilizzato il saggio colorimetrico MTT, che permette di valutare la vitalità cellulare tramite determinazione dell'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi; tale attività viene misurata dalla capacità del suddetto enzima di catalizzare la reazione di ossidazione del sale di tetrazolio (MTT) a formazano, la cui concentrazione viene determinata fotometricamente. Questo saggio è particolarmente indicato per valutare l'effetto biologico di sostanze idrosolubili (9).

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di  $1 \times 10^4$  cellule/pozzetto e sono state fatte arrivare a sub-confluenza (24 ore). Il terreno di coltura è stato quindi rimosso dalle cellule e sostituito con quello contenente il prodotto da esaminare oppure ipoclorito di sodio privo di enzima, mentre nei pozzetti di controllo è stato aggiunto terreno fresco. La vitalità cellulare è stata determinata - dopo 5 minuti di incubazione - tramite il saggio MTT.

Il saggio MTT è stato eseguito secondo la seguente modalità [1]: una soluzione di MTT in tampone fosfato (PBS) (5 mg/mL, 20 µL) è stata aggiunta al mezzo ed il tutto è stato incubato a 37°C per 4 ore. I cristalli intracellulari di formazano ottenuti sono stati solubilizzati con una soluzione di HCl in isopropanolo ( $4 \times 10^{-2}$  N, 200 µL). La densità ottica (D.O.) della soluzione presente in ognuno dei 96 pozzetti della piastra è stata determinata con un fotometro automatico per micropiastre (Packard Spectracount, Packard BioScience Company, Meridien U.S.A.) ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

La citotossicità è stata calcolata in base alla seguente equazione:

$$\text{Mortalità cellulare \%} = \frac{\text{D.O. controllo} - \text{D.O. campione}}{\text{D.O. controllo}} \times 100$$

### Condizioni sperimentali

Vista l'elevata citotossicità dell'ipoclorito di sodio è stato necessario diluire preventivamente sia i campioni contenenti l'enzima che le soluzioni del solo ipoclorito: ciò al fine di poter effettuare correttamente gli studi di citotossicità dei materiali in oggetto.

I campioni sono stati ottenuti sciogliendo volumi definiti delle soluzioni di ipoclorito di sodio in IMEM come sotto riportato:

#### Soluzione madre di NaClO (5%)

#### Soluzioni finali di NaClO

0.050% (2.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.025% (1.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.012% (0.5 µL in 200 µL di IMEM)

#### Soluzione madre di NaClO (3%)

0.050% (2.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.025% (1.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.012% (0.5 µL in 200 µL di IMEM)

#### Soluzione madre di NaClO (5%) + Enzima

0.050% (2.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.025% (1.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.012% (0.5 µL in 200 µL di IMEM)

#### Soluzione madre di NaClO (3%) + Enzima

0.050% (2.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.025% (1.0 µL in 200 µL di IMEM)  
0.012% (0.5 µL in 200 µL di IMEM)

bella 2 vengono riportati i risultati comparativi relativi alla presenza o meno dell'enzima nell'ipoclorito.

I risultati evidenziano come l'ipoclorito risulta essere, come noto, altamente citotossico in tutte le concentrazioni esaminate, mentre la presenza dell'enzima riduce significativamente tale effetto a valori medi di tossicità in tutte le diluizioni eseguite, tranne la prima (2 µL di soluzione di enzima + ipoclorito di sodio al 5%).

## DISCUSSIONE

I dati del presente studio evidenziano una marcata citotossicità di entrambe le concentrazioni delle soluzioni irriganti con ipoclorito di sodio (3%-5%) dato che era logico supporre, vista la precipua necessità di tali soluzioni, di svolgere una efficace azione disinfettante aspecifica, presupposto indispensabile per una corretta sterilizzazione del sistema dei canali radicolari. Tra le due differenti soluzioni l'ipoclorito di sodio puro è quella che ha mostrato la più elevata azione citotossica, mentre l'aggiunta dell'enzima tende a ridurre la citotossicità. Il dato quindi sembrerebbe favorire l'uso clinico della soluzione sperimentale, ma si presta ad altre considerazioni di interesse clinico.

Una minore tossicità potrebbe anche essere interpretata come una minore azione antibatterica, anche se in realtà tale efficacia dipende non solo dall'effetto citotossico, ma anche dalle capacità di detergere lo spazio endodontico dissolvendo i detriti pulpari. Infatti, una accurata detersione in igiene è spesso intimamente legata ad una valida disinfezione. La presenza di un enzima proteolitico nella soluzione irrigante dovrebbe servire appunto a migliorare tale detersione, e di conseguenza la disinfezione, specialmente in quelle aree ove la strumentazione non riesce ad assolvere appieno tali compiti, per la presenza di anatomie complesse, istmi, irrego-

### Analisi statistica

I dati relativi a ciascuna diluizione sono stati eseguiti in sestuplicati, indi raccolti ed analizzati statisticamente con t-test accoppiato.

## RISULTATI

I risultati, espressi come percentuale di mortalità rispetto al controllo, sono riportati nella Tabella 1 come media e DS nelle diverse diluizioni per le quattro tipologie di materiali testato: ipoclorito al 3% e 5%, con o senza enzima. Nella Ta-

	NaClO 5% 2.0 µL	NaClO 5% 1.0 µL	NaClO 5% 0.5 µL	NaClO 3% 2.0 µL	NaClO 3% 1.0 µL	NaClO 3% 0.5 µL
Media	76,04	75,78	68,29	75,89	67,52	62,45
DS	15,53	9,64	16,11	13,12	12,29	9,85
	Enzima + NaClO 5% 2.0 µL	Enzima + NaClO 5% 1 µL	Enzima + NaClO 5% 0.5 µL	Enzima + NaClO 3% 2 µL	Enzima + NaClO 3% 1 µL	Enzima + NaClO 3% 0.5 µL
Media	74,86	54,41	38,91	42,23	24,46	28,48
DS	5,53	9,312	11,69	13,69	13,88	16,44

**Tab. 1** - Tossicità dei campioni nelle diverse diluizioni (espressa come percentuale di mortalità rispetto al controllo).

	2.0 µL	1.0 µL	0.5 µL	2.0 µL	1.0 µL	0.5 µL
Differenze	NS	Significativa*	Significativa*	Significativa*	Significativa*	Significativa*
* = Ipoclorito+enzima significativamente meno citotossico nella diluzione indicata.						

Tab. 2 - Comparazione fra irriganti con o senza enzima.

larità, etc. Appare evidente che tali affermazioni dovranno essere suffragate in futuro da una serie di studi sperimentali e clinici, atti a verificare tale incremento nella detersione e disinfezione dello spazio endodontico.

I dati emersi da questo studio servono solo ad evidenziare che l'aggiunta di enzima non sembra comportare effetti più sfavorevoli rispetto all'ipoclorito puro per quanto concerne le proprietà biologiche, anche se l'utilizzo clinico non si può considerare scevro da complicazioni. Visto che in generale tutti i prodotti testati hanno una citotossicità alta,

proprio perché svolgono la loro azione primaria come disinfettanti canalari, si consiglia di utilizzarli con molta cautela evitando di estrarli fuori apice in ampia quantità durante il trattamento. Infatti il loro uso deve essere limitato solo all'interno del canale e devono essere prese tutte le precauzioni necessarie per evitare la loro estrusione al di fuori del forame apicale quali: il controllo della lunghezza di lavoro e l'introduzione delicata dell'irrigante all'interno del canale associata all'utilizzo di aghi molto sottili e mai impegnati nel lume del canale radicolare. Tutto questo perché le

soluzioni irriganti risultano essere fortemente ipertoniche, caustiche e irritanti; pertanto l'eventuale fuoriuscita di tali sostanze in notevole quantità può causare nei tessuti periapicali diversi effetti: processi infiammatori, in alcuni casi molto gravi, e parestesie, talvolta permanenti (10-12).

## CONCLUSIONI

Dai risultati fin qui ottenuti si evince come, in queste condizioni sperimentali, la tossicità osservata è da ascrivere principalmente all'ipoclorito di sodio; potrebbe comunque essere interessante ripetere le prove in presenza di enzima senza ipoclorito per poter verificare la sua attività sulle cellule indipendentemente dalla presenza di tale detergente.

## BIBLIOGRAFIA

- Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J* 1998;43(4):250-6.
- Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dental tubules. *In Endod J* 1998; 31: 8-14.
- Bloomfield SF, Uso EE. The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. *J Hosp Infect* 1985;6:20-30.
- Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod* 1995;21:513-5.
- Krause TA, Liewehr FR, Chin-lo Hahn. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline and citric acid on enterococcus faecalis. *J Endod* 2007;33: 28-30.
- Van Der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J* 2006;39:472-6.
- ISO: 7405: Dentistry- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry- *Test methods for dental materials*; 1997.
- Barlean L, Danila I, Avram G, Cotor F, Durnea C. The use of cell cultures in the cytotoxicity testing of dental materials. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 1992;96:111-3.
- Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. *In vitro* synergistic, antagonistic, and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *J Biomed Mater Res* 1992; 26:1297-309.
- Ferraz CC, Gomes NV, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Apical extrusion of debris and irrigants using two hand and three engine-driven instrumentation techniques. *Int Endod J* 2001;34:354-8.
- Mehra P, Clancy C, Wu J. Formation of a facial hematoma during endodontic therapy. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:67-71.