

Maria Teresa Sberna*
Lorenzo Veschini*
Roberto Sorrentino*
Arnaldo Castellucci
Enrico F. Gherlone*

Università Vita-Salute-San Raffaele-Milano
Dipartimento di Odontoiatria
Direttore: Prof. Enrico F. Gherlone

Corrispondenza:
Dott.ssa Maria Teresa Sberna
Piazza degli Ulivi, 27
Arenzano (Ge)
E-mail: mariateresasberna@libero.it

Pervenuto in Redazione il 14 giugno 2006
Accettato per la pubblicazione il 21 luglio 2006

Valutazione *in vitro* della citotossicità del Resilon su cellule endoteliali umane

In vitro cytotoxicity of Resilon on human endothelial cells

RIASSUNTO

Scopo: scopo del presente studio *in vitro* è stato quello di valutare microscopicamente la citotossicità del Resilon su cellule endoteliali.

Metodologia: sono state utilizzate cellule endoteliali ibride (EAHy). Tre differenti metodiche di analisi sono state impiegate al fine di esaminare la morfologia cellulare, l'immunofluorescenza e l'apoptosi. Sono state analizzate morfologia e vitalità cellulare tramite positività alla annexina V/PI. Coni di gutta-percha e Resilon sono stati segmentati e posti in diretto contatto con le colture cellulari. Le cellule sono state, inoltre, incubate con cemento Epiphany in fase sia non polimerizzata che polimerizzata. Fotografie digitali al microscopio sono state scattate dopo 24 ore, 48 ore ed 1 settimana di incubazione. L'apoptosi è stata valutata pigmentando le cellule con annexina V/PI. Le indagini in microscopia a fluorescenza sono state effettuate con anticorpi anti-annexina V-FITC.

Risultati: la gutta-percha ha indotto modificazioni morfologiche tali da esitare nella morte cellulare. Il cemento Epiphany in fase polimerizzata non ha interferito con la morfologia né con la vitalità cellulare; il medesimo materiale in fase non polimerizzata è risultato tossico per le cellule EAHy.

Conclusioni: il Resilon si è dimostrato biocompatibile ed in futuro, da un punto di vista biologico, potrà essere considerato un valido sostituto della gutta-percha.

Parole chiave:

Resilon, citotossicità, cellule endoteliali.

ABSTRACT

Aim: the present *in vitro* study aimed at microscopically evaluating the cytotoxicity of Resilon on endothelial cells. **Methodology:** endothelial hybrid cells (EAHy) were used. Three different analyses regarding cell morphology, immunofluorescence and detection of apoptosis were performed.

The cells were investigated for morphology and viability by means of Annexin V/PI positivity. Gutta-percha and Resilon cones were cut in pieces and put into direct contact with the monolayer of cells. Cells were also incubated with polymerized and unpolymerized Epiphany cement. After 24h, 48h and 1 week of incubation digital microscopic photographs were shot. Apoptosis was evaluated by staining cells with Annexin V/PI. The fluorescence microscope analyses were performed with antibodies against annexin V-FITC.

Results: gutta-percha induced changes in cell morphology resulting in cell death; polymerized Epiphany did not interfere with cell morphology and viability; unpolymerized Epiphany was proved to be toxic for EAHy cells.

Significance: Resilon proved to be biocompatible and safe to substitute gutta-percha in endodontics.

Key words:

Resilon, cytotoxicity, endothelial cells.

INTRODUZIONE

La biocompatibilità dei materiali dentari è una caratteristica di primaria importanza, dal momento che l'eventuale presenza di componenti tossici potrebbe determinare infiammazione e/o degenerazione dei tessuti circostanti (Willerhausen, 2000). In particolare, i materiali da otturazione canalare devono presentare caratteristiche di assoluta biocompatibilità giustificata dalla non infrequente possibilità di entrare in contatto diretto con i tessuti parodontali profondi attraverso il forame apicale e/o eventuali canali accessori (Willerhausen, 2000; Szep et al., 2003). Numerosi studi hanno dimostrato che molti dei riempitivi canalari impiegati in endodonzia possono causare flogosi tissutale (Willerhausen, 2000; Chang & Chou, 2001; Szep et al., 2003; Shipper et al., 2005). Sebbene venga generalmente considerata come il riempitivo canalare di elezione, anche la gutta-percha può risultare citotossica in seguito al rilascio di ioni zinco nei fluidi parodontali ed alla loro susseguente microinfiltrazione (Moorer & Genet, 1982).

Le metodiche *in vitro* che impiegano colture cellulari si sono dimostrate utili per valutare la biocompatibilità dei materiali dentari (Willershausen, 2000; Szep et al., 2003; Chang & Chou, 2001; Shipper et al., 2005; Moorer & Genet, 1982). Rappaport et al. (1964) sono stati i primi a descrivere in letteratura tali tecniche per indagare la tolleranza biologica dei riempitivi endodontici. Svariate linee cellulari sono state impiegate a tal scopo, tra cui fibroblasti, cellu-

le epiteliali e linfoblasti (Szep et al., 2003; Pascon & Spangberg, 1990). Recentemente è stato sviluppato ed introdotto in commercio il Resilon, un materiale da otturazione canalare costituito da un polimero sintetico termoplastico del policaprolattone (Hiraishi et al., 2005). Tale materiale agisce come un monoblocco aderendo alla dentina scanalare tramite l'Epiphany, un riempitivo costituito da resina composita duale (Shipper et al. 2005, Hiraishi et al. 2005). Tra i riempitivi costituenti il Resilon si ritrovano solfato di bario, ossicloruro di bismuto e vetri bioattivi (Shipper et al., 2005).

Il presente studio *in vitro* è stato disegnato per valutare l'eventuale citotossicità del Resilon sulle cellule endoteliali. L'ipotesi era che nulla stabiliva che non vi fossero differenze in termini di morfologia e vitalità tra le cellule tenute in coltura con guttaperca e con Resilon.

MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate per il presente studio cellule endoteliali ibride (EAHy), ottenute dalla fusione di cellule endoteliali umane delle vene ombelicali (HUVEC; Sigma-Aldrich s.r.l., Milano, Italia) con cellule del carcinoma di Lung (Xenogen Corporation, Alameda, CA, USA). In seguito a tale fusione, le cellule EAHy sono state immortalizzate.

Tre differenti metodiche di analisi sono state impiegate al fine di esaminare la morfologia cellulare, l'immunofluorescenza e l'apoptosi.

Le cellule sono state coltivate con terreno di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich) implementato con siero bovino fetale BioWhittaker al 10% (FBS; Cambrex Bio Science Corporation, Verviers, Belgio) e supplemento di crescita HAT (Sigma-Aldrich).

Morfologia - 100.000 cellule EAHy/pozzetto sono state coltivate in una piastra a 24 pozzetti (Corning Inc., Corning, NY, USA). Dopo 48 ore di incubazione le cellule si presentavano confluenti formando un monostrato (Fig. 1). Coni di guttaperca (Hygienic, Coltene/Whale-

dent Inc., Mahwah, NJ, USA) e Resilon (Resilon Research LLC, Madison, CT, USA) sono stati segmentati e posti a diretto contatto con il monostrato cellulare (1 pezzo/pozzetto). Analogamente, il cemento Epiphany (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT, USA) in fase sia polimerizzata sia non polimerizzata è stato messo in contatto con le cellule in coltura; la polimerizzazione è stata effettuata seguendo fedelmente le indicazioni del produttore. I pozzetti non trattati sono stati impiegati come controllo. Tutti gli esami sperimentali sono stati ripetuti tre volte.

Fotografie digitali al microscopio sono state scattate dopo 24 ore, 48 ore ed 1 settimana di incubazione utilizzando una macchina fotografica digitale collegata ad un microscopio ottico, in modo da poter valutare la morfologia cellulare.

Rilevamento della apoptosi - I fenomeni apoptotici sono stati valutati pigmentando le cellule con annexina V coniugata con fluoresceina (FITC; Bender Medical System, Prodotti Gianni, Milano, Italia), al fine di evidenziare l'esposizione di fosfatidil-serina sulla superficie esterna della membrana cellulare, e con ioduro di propizio (PI; Bender Medical System, Prodotti Gianni).

In sintesi, 100.000 cellule EAHy/pozzetto sono state coltivate in una piastra a 24 pozzetti fino a risultare confluenti. Analogamente a quanto descritto in precedenza, i coni di guttaperca e Resilon nonché il cemento Epiphany sono stati posti in diretto contatto con il monostrato cellulare (2 pezzi/pozzetto). I pozzetti non trattati sono stati impiegati come controllo. Dopo 24 ore, i pozzetti sono stati accuratamente sottoposti a due lavaggi con PBS (Cambrex Bio Science Corporation) contenente ioni

Ca^{++} e Mg^{++} e successivamente incubati con anticorpi anti-annexina V-FITC ad una concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per 1 ora. Prima di effettuare le indagini in microscopia a fluorescenza, le cellule sono state nuovamente sottoposte a due lavaggi con PBS contenente ioni Ca^{++} e Mg^{++} ; successivamente è stato aggiunto PI.

RISULTATI

Le cellule EAHy incubate con guttaperca per uno o più giorni sono risultate alterate nella loro vitalità (Fig. 2A). Concordemente con tale evidenza, il rilevamento della apoptosi ha mostrato che le cellule EAHy presentavano una doppia positività alla annexina V/PI (Fig. 2B). Viceversa, le cellule EAHy incubate con i coni di Resilon hanno mantenuto invariata la loro morfologia a ciottolo (Fig. 3A) ed hanno mostrato una doppia negatività alla annexina V/PI (Fig. 3B).

Dopo un prolungato periodo di incubazione (1 settimana), le cellule EAHy risultavano incapaci di riparare i danni indotti dalla guttaperca (Fig. 4). Al contrario, dopo il medesimo tempo di incubazione prolungata, le cellule EAHy mantenevano la propria morfologia e vitalità in presenza di Resilon (Fig. 5). Inoltre, le cellule EAHy risultavano aderenti ed in grado di cresce-



Fig. 1 - Monostrato di cellule endoteliali ibride dopo 48 ore di incubazione.

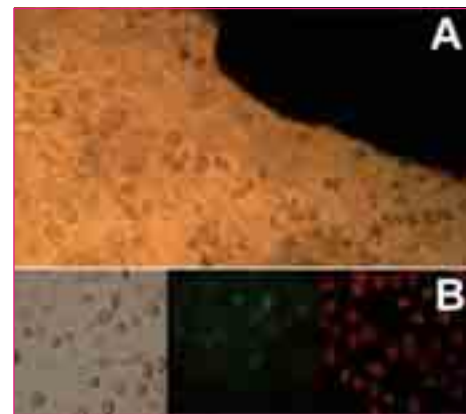


Fig. 2 - Cellule endoteliali ibride dopo 24 ore di incubazione con guttaperca. A: vitalità alterata; B: doppia positività alla annexina V/PI nel rilevamento della apoptosi.

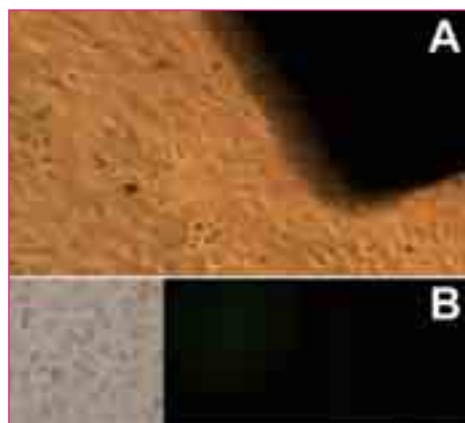


Fig. 3 - Cellule endoteliali ibride dopo 24 ore di incubazione con Resilon. A: morfologia a ciottolo; B: doppia negatività alla annexina V/PI nel rilevamento della apoptosi.



Fig. 4 - Cellule endoteliali ibride dopo 1 settimana di incubazione con gutta-perca.



Fig. 5 - Cellule endoteliali ibride dopo 1 settimana di incubazione con Resilon.

re sui coni di Resilon (Fig. 6) laddove ciò non avveniva in presenza di gutta-perca.

Nelle medesime condizioni sperimentali, il cemento Epiphany in fase non polimerizzata si è dimostrato altamente tossico per le cellule EAHy (Fig. 7) che, da un punto di vista morfologico, si presentavano simili alle cellule incubate con gutta-perca (Fig. 8).

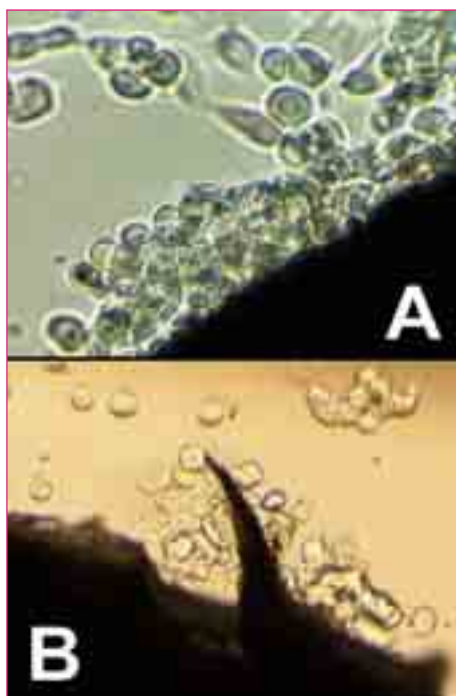


Fig. 6 - Adesione delle cellule endoteliali ibride. A: positiva su Resilon; B: negativa su gutta-perca.

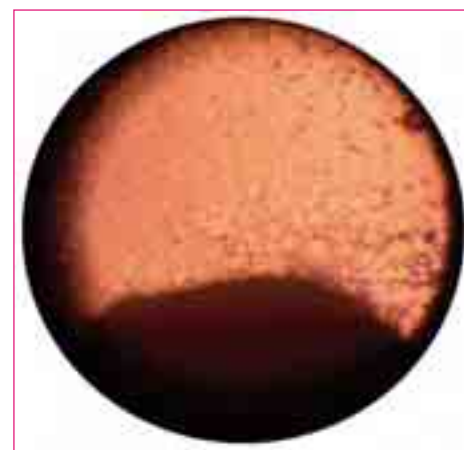


Fig. 7 - Cellule endoteliali ibride danneggiate dopo 1 settimana di incubazione con Epiphany non polimerizzato.



Fig. 8 - Cellule endoteliali ibride stressate in allontanamento dalla gutta-perca dopo 1 settimana di incubazione.

DISCUSSIONE

Nel presente studio sono state impiegate tecniche *in vitro* per valutare la biocompatibilità di differenti materiali da otturazione endodontica: gutta-perca, Resilon ed Epiphany. Sono state valutate microscopicamente sia le reazioni e la crescita delle colture cellulari sia le modificazioni fisiologiche e patologiche delle cellule. L'indagine mediante immunofluorescenza è stata utilizzata come metodica qualitativa per visualizzare in modo diretto l'espressione di specifiche molecole.

Svariate linee cellulari sono state impiegate in studi sperimentali *in vitro* (Rappaport et al., 1964; Pascon & Spangberg, 1990; Szep et al., 2003). Nel settore dell'endodonzia, gli effetti dei materiali dentari sulle cellule endoteliali risultano di particolare interesse. L'endotelio è costituito da una popolazione cellulare che riveste tutti i vasi sanguigni del-

l'organismo umano e che è caratterizzata dalla capacità di generare nuovi vasi sanguigni a partire da cellule progenitrici (vasculogenesi) o da vasi preesistenti (angiogenesi). Da quanto riportato si deduce che l'utilizzo di riempitivi canalari potenzialmente tossici va evitato, dal momento che il danneggiamento delle cellule endoteliali può esitare nel rallentamento, se non addirittura nella abolizione dei processi di riparazione tissutale.

Le metodiche *in vitro* sono state ampiamente descritte in letteratura al fine di valutare gli effetti del rilascio dei costituenti dei materiali dentari e l'eventuale citotossicità di tali materiali sulle colture cellulari (Rappaport et al., 1964; Moorer & Genet, 1982; Pascon & Spangberg, 1990; Willershausen, 2000; Chang & Chou, 2001; Szep et al., 2003; Shipper et al., 2005). Conclusioni contrastanti sono state riportate in merito alla citotossicità della gutta-perca sulle cellule umane (Moorer & Genet 1982, Chang & Chou 2001). Il presente stu-

dio ha confermato la potenziale citotossicità di tale materiale dovuta, presumibilmente, al rilascio di componenti tossici quali gli ioni zinco (Moorer & Genet 1982, Chang & Chou 2001) (Figg. 2 e 4).

Indipendentemente dal materiale testato, il periodo di incubazione non ha influenzato la risposta cellulare: la guttaperca ha determinato danneggiamento cellulare anche dopo sole 24 ore di incubazione (Figg. 2 e 4), laddove il Resilon non ha sortito i medesimi effetti negativi (Figg. 3 e 5). Concordemente con altri studi (Moorer & Genet, 1982; Chang & Chou, 2001; Szep et al., 2003), le modificazioni osservate nelle colture cellulari poste in contatto con la guttaperca sono state probabilmente causate dal rilascio di elementi tossici quali gli ioni zinco. La conseguente condizione di stress metabolico ha determinato un allontanamento

delle cellule dall'origine del danno, ossia dalla guttaperca (Fig. 8). Il cemento Epiphany in fase non polimerizzata è risultato altamente tossico per le cellule EAHy ma il materiale ha perduto tale citotossicità a seguito della polimerizzazione: tale fenomeno trova spiegazione nel fatto che, prima della polimerizzazione, il materiale contiene monomeri liberi di metacrilato, i quali sono ben noti essere causa di danni a carico delle cellule (Shipper et al., 2005).

CONCLUSIONI

Considerando le limitazioni del disegno sperimentale del presente studio, dai risultati ottenuti possono essere tratte le seguenti conclusioni:

- la guttaperca ha indotto modificazioni morfologiche tali da esitare nella morte cellulare;
- il cemento Epiphany in fase polimerizzata non ha interferito con la morfologia né con la vitalità cellulare;
- il cemento Epiphany in fase non polimerizzata si è dimostrato tossico per le cellule EAHy;
- il tempo di incubazione non ha influenzato la risposta positiva o negativa delle cellule ai materiali testati.

I dati ottenuti dalle prove sperimentali *in vitro* mostrano che il Resilon non ha indotto alcuna reazione tossica a carico delle linee cellulari testate. Ulteriori indagini dovranno essere condotte per confermare i risultati del presente studio ed appropriati disegni sperimentali sia *in vitro* che *in vivo* saranno necessari per approfondire la biocompatibilità del Resilon.

BIBLIOGRAFIA

1. Willershausen B, Briseño MB, Schäfer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod* 2000; 26: 703-7.
2. Szep S, Grumann L, Ronge K, Schriever A, Schultze M, Heidemann D. *In vitro* cytotoxicity of medicated and non-medicated gutta-percha points in cultures of gingival fibroblasts. *J Endod* 2003; 29: 36-40.
3. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of halothane on human gingival fibroblast cultures *in vitro*. *J Endod* 2001; 27: 82-4.
4. Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M. Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or Resilon. *J Endod* 2005; 31: 91-6.
5. Moorer WR, Genet JR. Antibacterial activity of gutta-percha cones attributed to the zinc oxide component. *Oral Surg* 1982; 53: 508-17.
6. Rappaport HM, Lilly GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1964; 18: 785-802.
7. Pascon EA, Spangberg LSW. *In vitro* cytotoxicity of root canal filling materials. 1: gutta-percha. *J Endod* 1990; 16: 429-33.
8. Hiraishi N, Papacchini F, Loushine RJ, Weller RN, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR. Shear bond strength of Resilon to a methacrylate-based root canal sealer. *Int Endod J* 2005; 38: 753-63.