

* Giuseppina Nocca
** Gianluca Gambarini
* Lia Ciccarelli
** Giampiero Bolognini
** Luca Testarelli
** Giancarlo Pongione
* Bruno Giardina
*** Alessandro Lupi

* Università Cattolica
del Sacro Cuore di Roma
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica
Direttore: Prof. Bruno Giardina
** Università degli Studi
di Roma "La Sapienza"
Cattedra di Materiali Dentali C.L.I.D.
Titolare: Prof. Gianluca Gambarini
*** Istituto di Riconoscimento
Molecolare - CNR di Roma
Direttore: Prof. Bruno Giardina

Corrispondenza:
Dott. Gianluca Gambarini
Circonvallazione Casilina, 124
00176 Roma

Studio di citotossicità *in vitro* di due cementi endodontici

In vitro cytotoxicity of two endodontic sealers

RIASSUNTO

Introduzione: un buon cemento endodontico deve essere ben tollerato da parte dei tessuti del periapice per evitare interferenze o ritardi nella cicatrizzazione tissutale. Scopo del presente lavoro è quello di valutare, secondo i dettami della normativa ANSI/ADA Spec. no. 41, la compatibilità biologica *in vitro* di due cementi per uso endodontico: un nuovo cemento a base siliconica RSA, Roeko Seal Automix (Roeko, Langenau, Germania) ed un tradizionale cemento all'ossido di zinco-eugenolo PCS, Pulp Canal Sealer (Kerr, Orange, CA, USA).

Materiali e metodi: lo studio è stato effettuato su una linea cellulare di fibroblasti murini, 3T3-Swiss, avvalendosi di due diverse modalità di contatto tra cellule e materiale: tramite eluato e attraverso un filtro con pori di 1 mm di diametro. Colture senza cementi e colture con il solo contenitore di vetro sono state impiegate come controllo. La vitalità cellulare, valutata mediante saggio di cattura del Rosso Neutro (NRU), è stata usata come parametro per determinare la tossicità dei materiali. I risultati sono stati raccolti ed analizzati statisticamente (ANOVA).

Risultati: si evidenziano, con entrambe le metodiche, differenze statisticamente significative per i due materiali testati. Infatti, lo RSA presenta una tossicità inferiore (10,32%) rispetto al PCS (28,76%) con il test di tossicità degli estratti a 24 ore, dato confermato anche nel caso del saggio di tossicità indiretta. In quest'ultimo caso il cemento RSA mostra una tossicità significativamente minore (4,4%) rispetto al PCS (27,01%).

Conclusioni: dai risultati ottenuti dal presente studio risulta evidente come l'assenza di eugenolo comporti una significativa riduzione della tossicità cellulare.

Parole chiave:

Cementi canalari, biocompatibilità, terapia endodontica.

ABSTRACT

Introduction: *in vitro* cell cultures have been widely used as a means of evaluating cytotoxicity of root canal filling materials. The aim of the present study was to investigate the biological compatibility of a new silicone-based endodontic sealer (RSA, Roeko Seal Automix - Roeko, Langenau, Germany) and compare it with a traditional zinc-oxide-eugenol (ZOE) based sealer (PCS, Pulp Canal Sealer - Kerr, Orange, CA, USA).

Material and methods: test procedures strictly followed ANSI-ADA Spec. no. 41. Mouse 3T3-Swiss fibroblasts were seeded, cultured and subsequently extracts of the cements were added. After 24 h of incubation, the cellular vitality of fibroblasts was evaluated by Neutral Red Uptake test (NRU) using two different methods of contact between fibroblasts and the tested materials. Data were collected and statistically analyzed (ANOVA).

Results: results showed that the tested materials exhibited statistically significant differences with both the testing methods. RSA was found to be less cytotoxic (10,32%) than PCS (28,76%) with the eluate method, and 4,4% (RSA) vs. 27,01% (PCS) with the indirect toxicity method.

Conclusions: hence, we may conclude that RSA is a more biocompatible material when compared to ZOE endodontic sealers, maybe due to the absence of eugenol in its chemical composition.

Key words:

Endodontic sealers, cytotoxicity, endodontic therapy.

INTRODUZIONE

La compatibilità biologica dei materiali impiegati in odontoiatria è un parametro di grande interesse clinico poiché i prodotti tossici eventualmente presenti in essi possono produrre irritazioni o degenerazioni dei tessuti circostanti, in grado di interferire, come può avvenire nel caso dei cementi endodontici, con i processi di guarigione delle ferite pulpo-periapicali. L'impiego di metodi di indagine *in vitro* offre la possibilità di studiare gli effetti conseguenti al rilascio dei componenti del prodotto testato su sistemi costituiti da cellule (1): le colture cellulari forniscono infatti un conveniente, controllabile e ripetibile mezzo per una iniziale valutazione della risposta biologica (2). Sono disponibili numerosi saggi di citotossicità in grado di misurare diversi parametri di biocompatibilità e la loro scelta dipende dalla natura chimica del materiale da esaminare (3): il saggio di integrità di membrana - basato sulla cattura del colorante Rosso Neutro (NRU) (4,5) - è molto usato per lo studio delle sostanze lipofile che alterano la struttura della membrana cellulare. In questa prova le cellule, dopo esposizione alle sostanze da testare, vengono incubate in presenza di Rosso Neutro e mentre quelle vitali catturano e trattengono il colorante, quelle morte (con membrana plasmatica o lisosomiale danneggiata) vengono liberamente attraversate dal colorante; la determinazione colorimetrica della quantità di Rosso Neutro trattenuto dalle cellule messe a contatto con le sostanze in esame, comparata con i controlli, permette di stabilire un indice di tossicità relativa delle sostanze stesse. Il saggio NRU è stato utilizzato da Babich

e coll. (6) per stabilire una relazione tra la struttura chimica dei composti e la loro tossicità, mentre l'uso delle colture cellulari nello studio della compatibilità dei cementi endodontici è stato introdotto da Rappaport e coll. (7); dai dati della letteratura si evince, ad esempio, che i cementi resinosi e quelli vetro-ionomerici, sottoposti ad eluizione per diversi giorni, non hanno mostrato reazioni citotossiche su colture cellulari di fibroblasti (8-10).

I principali requisiti che un cemento endodontico deve possedere sono ormai codificati da anni: a) capacità di aderire e sigillare tridimensionalmente lo spazio canalare, b) stabilità dimensionale e c) assenza di citotossicità associata ad una buona tolleranza da parte dei tessuti periapicali, al fine di evitare, nei casi di accidentale fuoriuscita dall'apice radicolare, interferenze o ritardi nei processi di cicatrizzazione tissutale legati alla presenza di eventuali lesioni (8).

Tra i numerosi prodotti utilizzati come cementi endodontici sono da annoverare l'ossido di zinco-eugenolo (ZOE) e le sue varianti rinforzate, le resine epossidiche, i vetro-ionomerici e - più recentemente - i siliconici. Capostipite di quest'ultima categoria è il cemento RSA, Roeko Seal Automix (Roeko, Langenau, Germania), introdotto di recente sul mercato, che per la sua composizione si discosta sostanzialmente dagli altri cementi endodontici in uso. Attualmente, infatti, i cementi ZOE o i resinosi rappresentano i materiali da otturazione canalare più diffusi.

Scopo del presente lavoro è quello di valutare, secondo i dettami della normativa ANSI/ADA Spec. no. 41, la compatibilità biologica *in vitro* di due cementi per uso endodontico: lo RSA, Roeko Seal Automix, ed il PCS, Pulp Canal Sealer (Kerr, Orange, CA, USA). Il primo è un nuovo materiale per l'otturazione del sistema dei canali radicolari pronto all'uso ed a base di polidimetilsilossano, olio di silicone, olio di paraffina, diossido di zirconio, acido esacloroplatinico (come catalizzatore), non contenente 4-allil-2-metossifenolo (eugenolo); il secondo è invece un materiale a base di ossido di zinco-eugenolo, usato da molti anni con successo in terapia endodontica. Per verificare gli effetti citotossici dei due suddetti cementi endodontici sulla linea di fibroblasti 3T3-Swiss, è stato utilizzato il saggio NRU in considerazione del fatto che i materiali in esame sono costituiti principalmente da molecole liposolubili.

MATERIALI E METODI

Reagenti: a meno di diversa indicazione tutti i prodotti chimici ed i reagenti (grado di purezza per colture cellulari) sono stati ottenuti da Sigma - Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

Cellule e trattamenti: la linea cellulare murina di fibroblasti 3T3 (*Swiss albino mouse*, fornita dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia) è stata fatta crescere - in incubatore a 37 °C con atmosfera di CO₂ a concentrazione 5% - in DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) contenente Hepes (10 mM), glucosio (1,0 g/L), NaHCO₃ (3,7 g/L), penicillina (100 unità/mL), streptomycin (100 µg/mL) e FCS (Siero Fetale Bovino) al 10%. Al fine di valutare gli effetti citotossici dei cementi sono stati utilizzati dei contenitori cilindrici di vetro (10x6x3 mm lunghezza x larghezza x diametro interno), appositamente preparati e sterilizzati per 15 minuti in autoclave alla temperatura di 121 °C ed alla pressione di 1 atm. In ogni contenitore è stato posto un cemento diverso, lavorato secondo le indicazioni della ditta produttrice; dopo 24 ore di riposo a temperatura ambiente sotto cappa sterile, i contenitori riempiti di cemento e quelli vuoti, utilizzati per verificare l'inerzia del vetro, sono stati collocati in piastre da 24 pozzetti con 1 mL di terreno di coltura e lasciati ad incubare 24 ore per permettere il rilascio di materiale.

Tossicità degli eluati: in ogni pozzetto di una piastra per colture cellulari da 96 pozzetti (Costar, Cambridge, MA) sono stati seminati 1 x 10⁴ fibroblasti in 200 µL di DMEM e, dopo coltura per 48 ore, è stato ottenuto un monostrato cellulare subconfluente. Da ciascun pozzetto precedentemente preparato sono stati prelevati 5 aliquote da 200 µL di terreno ed ogni aliquota è stata quindi aggiunta ad un monostrato cellulare mediante cambio del mezzo di coltura; uguali quantità di DMEM sono state poste anche nei pozzetti di controllo. La mortalità cellulare è stata valutata - dopo 24 ore di incubazione - mediante il saggio NRU, secondo la procedura descritta da Borenfreund e Puerner (4). Una soluzione acquosa di Rosso Neutro allo 0.4% è stata aggiunta al mezzo presente in ogni pozzetto in rapporto di volume 1:80, al fine di ottenere una concentrazione di colorante pari a 50 µg/mL; dopo incubazione per 4 ore a 37° C, il supernatante è stato rimosso ed il Rosso Neutro intracellulare è stato solubilizzato con 200 µL di una soluzione acquosa di etanolo al 50% contenente acido acetico

all'1%. L'assorbanza della soluzione presente in ogni pozzetto è stata misurata utilizzando un fotometro automatico per micropiastre (Packard Spectracount™, Packard BioScience Company, Meriden USA) alla lunghezza d'onda di 540 nm. Per ogni esperimento - effettuato in sestuplicato - la tossicità cellulare è stata calcolata attraverso la seguente equazione (1):

$$\% \text{ mortalità cellulare} = \frac{\text{OD controllo} - \text{OD campione}}{\text{OD controllo}} \times 100$$

Tossicità indiretta: per valutare la citotossicità indiretta dei cementi in esame i fibroblasti 3T3 sono stati seminati alla concentrazione di 30.000 cellule/cm² in piastre da 24 pozzetti e lasciati crescere per 72 ore. I contenitori di vetro con il cemento sono stati aggiunti ai pozzetti adagiandoli su apposite membrane per colture cellulari con pori di 1 µm di diametro (Falcon-Beckton Dickinson, USA); analoga procedura è stata utilizzata sia per i contenitori vuoti di controllo che per il solo DMEM. Dopo 24 ore di incubazione la vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio NRU.

Analisi statistica: ogni valore rappresenta la media di tre esperimenti, usando sei replicati di ogni materiale per esperimento, e tutti i risultati sono stati espressi come media SEM. I gruppi di medie sono stati comparati mediante analisi della varianza (ANOVA), seguita da una comparazione multipla delle medie mediante il metodo Student-Newman-Keuls. Quando necessario, sono state eseguite comparazioni di medie con il metodo t-Student ed un valore di p<0.05 è stato considerato significativo.

RISULTATI

Tossicità degli estratti a 24 ore. Nella Figura 1 e nella Tabella 1 è riportato l'effetto citotossico dei due cementi. Dai dati ottenuti risulta che il Pulp Canal Sealer ha una tossicità significativamente più elevata rispetto al cemento RSA, Roeko Seal Automix sui fibroblasti 3T3-Swiss.

Tossicità indiretta. La Figura 2 e la Tabella 2 mostrano i valori di citotossicità dei due cementi in esame. Anche con questa diversa metodica, il Pulp Canal Sealer mostra una tossicità significativamente più elevata (27.01%) del controllo (7.19%) e del cemento RSA Roeko Seal Automix (4.4%).

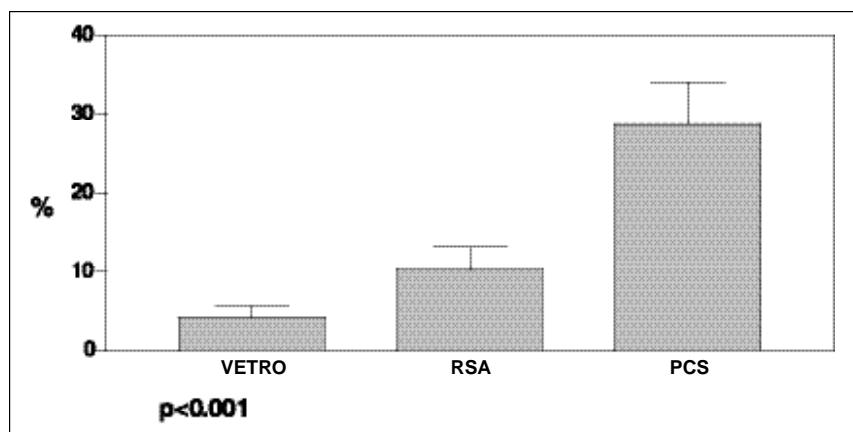


Fig. 1 - Tossicità degli estratti a 24 ore.

	Media	SEM	Numero dei campioni
Vetro	4.19 %	±1.4	24
RSA	10.32 %	±2.92	24
PCS	28.76 %	±5.24	24

Tab. 1 - Tossicità degli estratti a 24 ore.

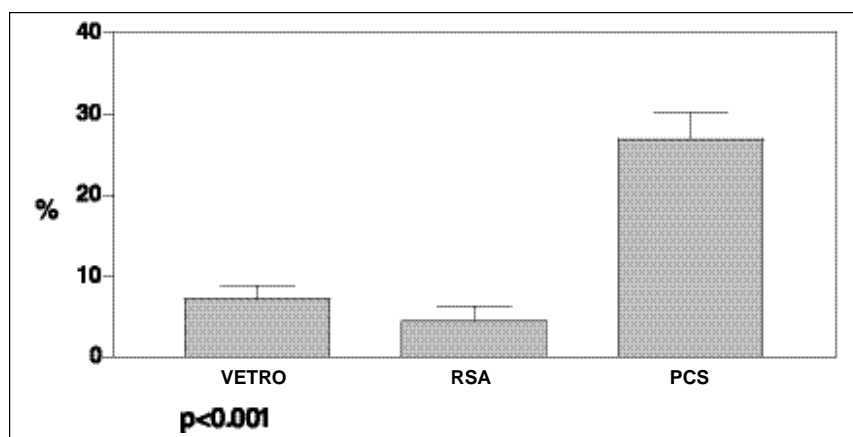


Fig. 2 - Tossicità indiretta.

	Media	SEM	Numero dei campioni
Vetro	7.19 %	±1.6	18
RSA	4.4 %	±1.8	18
PCS	27.01 %	±3.2	18

Tab. 2 - Tossicità indiretta.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli studi *in vivo* su animali ed i test clinici mostrano principalmente il verificarsi di un fenomeno, ma non chiariscono il meccanismo biochimico che ne è alla base, mentre tale informazione si può ottenere solo eseguendo prove *in vitro*. In letteratura sono presenti numerosi studi che riguardano la citotossicità dei cementi endodontici e vi sono differenti opinioni a riguardo, per lo più legate alla differente comparazione dei materiali testati. Ad esempio, Willershausen e coll. (8) riportano per il CRCS, un cemento con idrossido di calcio, un'alta citotossicità iniziale che diminuisce con il tempo; Gerosa e coll. (11) riferiscono di un'elevata citotossicità per l'AH26 e bassa per l'Endomethasone, mentre Molloy e coll. (12) ritengono che l'AH26 abbia una buona biocompatibilità. In realtà vi possono essere differenze sulla biocompatibilità dei materiali endodontici legate sia al tipo di prove, *in vivo* (su animali) ed *in vitro*, sia, come in questo caso, in base al test prescelto. Infatti, ad esempio, alcuni test evidenziano danni a strutture idrosolubili mentre altri a strutture liposolubili, per cui un particolare materiale può risultare più o meno tossico a seconda che venga usato o meno un determinato tipo di saggio. Per tali motivi gli studi di biocompatibilità *in vitro* dovrebbero essere eseguiti utilizzando almeno due differenti metodiche, così da confrontare tra loro i risultati e ricavarne conclusioni significative. Inoltre non va trascurato di menzionare il fatto che molti materiali presenti in commercio hanno mostrato un certo grado di tossicità cellulare quando sono stati testati *in vitro*, anche se tali effetti sono risultati essere compatibili con il normale utilizzo clinico (9,13). È stato ampiamente dimostrato come la citotossicità dei cementi a base di ossido di zinco-eugenolo sia attribuibile al rilascio di quest'ultimo (11): l'eugenolo, infatti, fissa le cellule in coltura in modo tale che non presentino più attività enzimatica; tale aspetto si traduce *in vivo* con la comparsa di aree localizzate di necrosi coagulativa laddove significative quantità di tale sostanza giungano a contatto con i tessuti biologici (8). Ovviamente una migliore biocompatibilità è da preferirsi sia in situazioni normali, per minimizzare eventuali interferenze con i processi di guarigione, sia

nei casi di errore iatrogeno, con ampia fuoriuscita di materiale d'otturazione nei tessuti periapicali.

Dall'analisi statistica dei risultati del presente studio si evidenzia come il cemento RSA, Roeko Seal Automix, privo di eugenolo, mostri sempre una tossicità meno elevata del cemento Pulp Canal Sealer, indipendentemente dal modo attraverso il quale viene realizzato il contatto tra cellula e materiale. Tali dati mostrano come si possa ricercare, utilizzando materiali alternativi ai tradizionali cementi all'ossido di zinco-eugenolo o

resinosi, una maggiore biocompatibilità, proprietà questa che non può che giovare (fermo restando la validità di altre caratteristiche del cemento, come quello di realizzare un sigillo ermetico stabile nel tempo), in particolare laddove si voglia minimizzare il rischio di lesioni iatrogene, dovute a sovraestensione dell'otturazione.

In conclusione dai risultati ottenuti risulta evidente come il cemento RSA, Roeko Seal Automix garantisca un'ottima compatibilità biologica grazie anche alla presenza di polimetilsilossano, che è un materiale di

comprovata scarsa citotossicità (14,15). L'assenza di eugenolo sembra essere responsabile di una significativa riduzione della tossicità cellulare. Tuttavia va ricordato che una migliore biocompatibilità dei cementi endodontici non esime l'operatore dall'eseguire una terapia canalare *lege artis* cercando di sigillare l'apice ed il complesso sistema dei canali radicolari e minimizzando l'eventuale fuoriuscita di materiale d'otturazione per non interferire negativamente con i processi di guarigione delle ferite pulpo-periapicali.

BIBLIOGRAFIA

1. Hashieh IA, Cosset A, Franquin JC, Camps J. *In vitro* cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *Endod* 1997;23(5):315-9.
2. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent Suppl* 2, 1994; 22: 6-11.
3. Pertot WJ, Stephan G, Tardieu C, Proust JP. Comparison of the intraosseous biocompatibility of Dyract and Super EBAS. *J Endod* 1997; 23:315-9.
4. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for Cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth* 1984; 9:7-9.
5. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1985; 24(2-3):119-24.
6. Babich H, Borenfreund E Applications of the neutral red Cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. *ATLA* 1990; 18: 129-44.
7. Rappaport HM, Lilly GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1964; 8:785-802.
8. Willershausen B, Marroquin BB, Schäfer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *Endod* 2000; 26(12):703-7.
9. Geurtsen W, Leinenbach F, Krage T, Leyhausen G. Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(5):592-7.
10. Leonardo MR, da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15(1):28-32.
11. Gerosa R, Menegazzi G, Borin M, Cavalleri G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *J Endo* 1995; 12:446-8.
12. Molloy D, Goldman M, White RR, Kabani S. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73(4):490-3.
13. Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod* 1990; 16(3):129-34.
14. Belanger MC, Marois Y. Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and *in vivo* studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review. *J Biomed Mater Res* 2001;58(5):467-77.
15. Ciapetti G, Cenni E, Fratelli L, Pizzoferrato A. *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. 1993 Apr;14(5):359-64.