

Vincenzo Campanella
Francesco Mangani
Antonio Libonati

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Cattedra di Odontoiatria Conservatrice
Titolare: Prof. Vincenzo Campanella

Corrispondenza:
Prof. Vincenzo Campanella
Via Monte delle Gioie, 24
00199 Roma
E-mail: vincampa@excite.it

Valutazione della embriotossicità di un nuovo cemento endodontico a base di ossidi minerali aggregati modificati: Aureoseal Ognà

Evaluation of the embriotoxicity of a new mineral trioxide aggregate modified endodontic sealer: Aureoseal Ognà

RIASSUNTO

Gli Autori valutano la compatibilità biologica di un nuovo materiale endodontico, l'Aureoseal Ognà, a base di ossidi minerali aggregati modificati. La valutazione viene effettuata mettendo a contatto il cemento, appena miscelato, con embrioni di topo della serie CD1, allo stadio di blastocisti iniziali. I dati sono confrontati con quelli ottenuti anche con il cemento Pro Root MTA e con cemento PCS. L'Aureoseal Ognà (hatching = 77,7%; outgrowth = 77,7%) e il Pro Root MTA (hatching = 77,7%; outgrowth = 66,6%) non hanno influenzato significativamente il normale sviluppo delle blastocisti, mentre i campioni con il PCS (hatching = 44,4%; outgrowth = 27,7%) hanno mostrato alterazioni della fase di sgusciamento e ancor più della capacità di adesione.

Parole chiave:

Embriotossicità, tossicità *in vitro*, cemento Portland, MTA.

ABSTRACT

The Authors evaluate the biocompatibility of a new mineral oxide aggregate modified endodontic sealer, Aureoseal Ognà. Evaluations were made using direct contact of ready mixed sealer with line CD1 embryos of 0-5 days. Data are compared with the results of same tests on Pro Root MTA and PCS. Aureoseal Ognà (hatching = 77,7%; outgrowth = 77,7%) and Pro Root MTA (hatching = 77,7%; outgrowth = 66,6%) did not significantly interfere with the physiological growth of the embryos, whilst PCS (hatching = 44,4%; outgrowth = 27,7%) determined significant alteration of hatching and outgrowth.

Key words:

Embryotoxicity, *in vitro* toxicity, Portland cement, MTA.

INTRODUZIONE

L'eziologia delle lesioni endodontiche periradicolari riconosce la presenza o la persistenza di microrganismi patogeni nel sistema dei canali radicolari e l'esistenza di comunicazioni tra l'ambiente endodontico e lo spazio parodontale (1, 2). Il successo del trattamento dipende quindi dalla efficacia antisettica delle tecniche di strumentazione e detersione dei canali radicolari e dalla qualità dell'otturazione dello spazio endodontico. Una detersione efficace è in grado di ridurre drasticamente la contaminazione microbica ma non consente la completa sterilizzazione. È pertanto assolutamente necessario, a completamento del trattamento endodontico, realizzare la completa separazione tra l'ambiente endodontico e quello parodontale periradicolare, effettuando una otturazione che sigilli tutte le comunicazioni esistenti. Le moderne tecniche di otturazione consigliano l'utilizzo di guttaperca associata ad un cemento "sealer" che può a volte estrudere nell'ambiente parodontale.

Il contatto che si verifica in caso di estrusione attraverso canali laterali o attraverso un apice radicolare non alterato da processi di rimaneggiamento o per sovrastrumentazione è comunque modesto e confinato a zone di piccole dimensioni. Al contrario in caso di apici immaturi, eccessivamente sovrastrumentati, o in caso di perforazioni iatrogene, il contatto che queste sostanze possono avere con tessuti vitali diviene rilevante e i rischi di potenziale tossicità sono proporzionalmente maggiori. La potenziale maggiore vulnerabilità dei tessuti periradicolari è asso-

ciata, inoltre, alle difficoltà operatorie legate alla impossibilità di lavorare in campo asciutto e di controllare con precisione il posizionamento del materiale. Pertanto nasce l'esigenza di disporre di un materiale con elevate caratteristiche di biocompatibilità, utilizzabile anche in ambiente umido, facilmente manipolabile, con elevate prestazioni meccaniche e con costi di produzione e di commercializzazione contenuti.

MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro si è voluto valutare la citotossicità di un cemento endodontico a base Portland indicato per la chiusura di perforazioni, incappucciamenti pulpari, pulpotomie ed apicificazioni. Nello studio si sono valutate la sopravvivenza e la proliferazione delle blastocisti in stadi evolutivi successivi al contatto diretto con i cementi endodontici. Il test è adatto per materiali che possono essere manipolati in piccole quantità e che hanno basso grado di idrosolubilità. I materiali da testare possono influenzare vari processi dello sviluppo dell'embrione a seconda del loro grado di tossicità, potendo determinare l'arresto della proliferazione cellulare, la morte precoce delle cellule, o alterazioni di processi specifici dello sviluppo dell'embrione pre-impianto, quali lo sgusciamento dalla zona pellucida e l'adesione del trofoblasto alla piastra (3).

Data la semplicità della metodica, il test di embriotossicità può essere proposto come mezzo di screening per la valutazione della biocompatibilità dei materiali di utilizzo odontoiatrico. Inoltre, ove necessario, dai risultati ottenuti si possono ricavare informazioni che guidano verso la scelta di test ad alta specificità.

Preparazione ed espianto delle blastocisti, test di embriotossicità

Il test di embriotossicità è stato effettuato su embrioni di topo di 3,5 giorni (blastocisti) (3). Gli embrioni sono stati coltivati per 3 giorni in una goccia di M16, sott'olio di paraffina contenente il 10% di *fetal calf serum* (FCS), incubato preventivamente per 72h a 37°C con campioni del materiale da testare appena miscelato. Sono stati valutati il numero di embrioni che hanno mostrato «hatching» e «outgrowth» (3), ovvero che sono sgusciati fuori dalla zona pellucida e hanno aderito alla capsula di Petri. Ottanta embrioni di 3,5 giorni (blastocisti) sono stati raccolti da topi femmine CD1 superovulate e messe in accoppiamento (3).

Gli embrioni, dapprima seminati in una sialerina contenente mezzo di cultura M2, precedentemente incubato a 37°C, sono stati osservati allo stereomicroscopio per scartare quelli palesemente già in degenerazione. Sono state selezionate 72 blastocisti che hanno consentito di ripetere l'esperimento tre volte (3). Sono state raccolte con la pipetta a bocca e trasferite nelle gocce di 12,5 µl di mezzo di cultura sotto olio, 6 blastocisti per l'Aureoseal Ogna (Giovanni Ogna e figli, Milano, Italia), 6 per Pro Root MTA (Dentsply, Johnson City, Tennessee, USA), 6 per il controllo positivo (mezzo di cultura D-MEM) e 6 per il controllo negativo PCS (Kerr, Romulus, Michigan, USA) (Fig. 1). Le colture preparate sono state poste in incubatore e dopo tre giorni si è valutato il numero di embrioni che, dopo essere fuoriusciti dalla zona pellucida, avevano aderito alla piastra mostrando «outgrowth» (3).

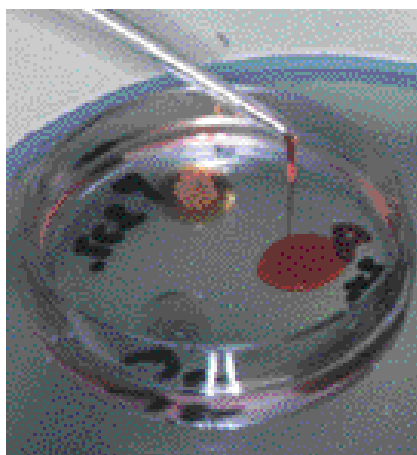


Fig. 1 - Semina delle blastocisti.

RISULTATI

I valori ottenuti per l'Aureoseal Ogna e il Pro Root MTA sono stati confrontati con quelli ottenuti con i controlli. Dopo tre giorni di coltura, osservando le tre piastre preparate per ogni campione al microscopio a contrasto di fase, si è potuto rilevare che l'Aureoseal Ogna e il Pro Root MTA non hanno influenzato significativamente il normale sviluppo delle blastocisti, valutato mediante la loro capacità

di «hatching» e «outgrowth» in coltura, mentre i campioni con il PCS hanno mostrato alterazioni della fase di sgusciamento e ancor più della capacità di adesione (Tab. A, B e C; Figg. 2 e 3).

La media statistica riportata in tabella D evidenzia se pur di poco un miglior indice preliminare di biocompatibilità da parte dell'Aureoseal Ogna rispetto al Pro Root MTA. Entrambi i materiali risultano essere ben tollerati e con un ottimo indice di biocompatibilità preliminare se paragonati al controllo negativo (PCS).

EVOLUZIONE STADI DIFFERENZIAATIVI	AUROSEAL OGNA	Pro Root MTA	CTRL+	CTRL-PCS
HATCHING	5/6 83,3%	5/6 83,3%	6/6 100%	3/6 50,0%
OUTGROWTH	5/6 83,3%	4/6 66,6%	6/6 100%	2/6 33,3%

Tab. A - Risultati di hatching e outgrowth della piastra A.

EVOLUZIONE STADI DIFFERENZIAATIVI	AUROSEAL OGNA	Pro Root MTA	CTRL+	CTRL-PCS
HATCHING	4/6 66,6%	4/6 66,6%	5/6 83,3%	2/6 33,3%
OUTGROWTH	4/6 66,6%	4/6 66,6%	5/6 83,3%	1/6 16,6%

Tab. B - Risultati di hatching e outgrowth della piastra B.

EVOLUZIONE STADI DIFFERENZIAATIVI	AUROSEAL OGNA	Pro Root MTA	CTRL+	CTRL-PCS
HATCHING	5/6 83,3%	5/6 83,3%	6/6 100%	3/6 50,0%
OUTGROWTH	5/6 83,6%	4/6 66,6%	6/6 100%	2/6 33,3%

Tab. C - Risultati di hatching e outgrowth della piastra C.

EVOLUZIONE STADI DIFFERENZIAATIVI media tot.	AUROSEAL OGNA	Pro Root MTA	CTRL+	CTRL-PCS
HATCHING	77,7%	77,7%	94,4%	44,4%
OUTGROWTH	77,7%	66,6%	94,4%	27,7%

Tab. D - Media statistica dei risultati di hatching e outgrowth.

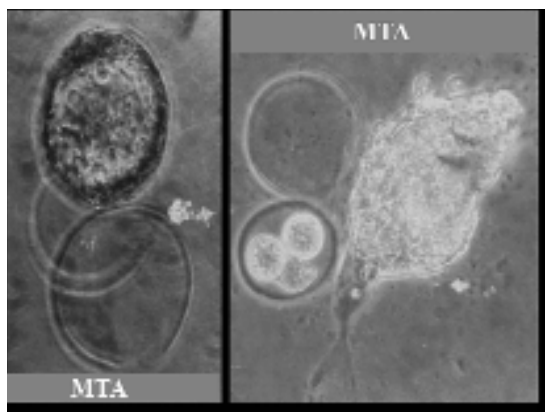


Fig. 2 - Aureoseal Ogna (hatching e outgrowth).

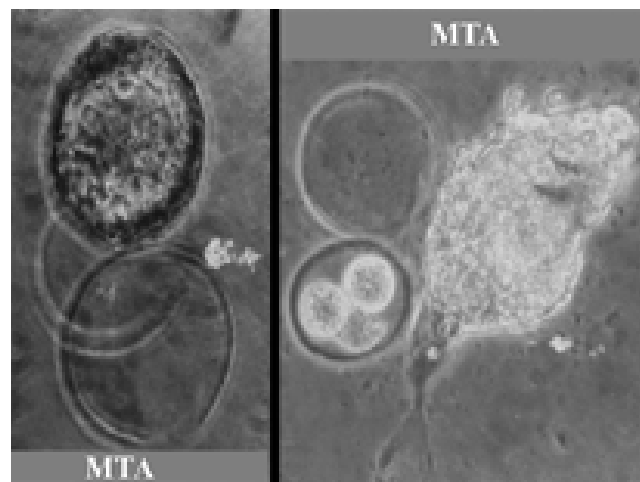


Fig. 3 - Pro Root MTA (hatching e outgrowth).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro si è voluto valutare la citotossicità di un cemento endodontico a base Portland indicato per la chiusura di perforazioni, incappucciamenti pulpari, pulpotomie ed apicificazioni. Situazioni queste che prevedono il contatto prolungato con i tessuti vitali periodontali e con la polpa dentale vitale, tessuto ad alta capacità riparativa per la presenza al suo interno di cellule staminali pluripoten-

ti (4,5). La valutazione della citotossicità generale *in vitro*, in accordo con la normativa ISO 10993 del 2000, prevede la applicazione di più prove con una serie di valutazioni a più stadi; e inoltre, nella scelta del modello sperimentale *in vitro*, vanno considerati la natura del campione che si deve valutare, il potenziale sito d'uso e la natura dell'uso.

In virtù di tali premesse, richiamandoci a test già applicati in medicina per valutare la fertilità (3, 6-9) e in riferimento ai protocolli di embriotossicità dell'ECVAM, si è voluto costruire un modello sperimentale di embriotossicità diretta *in vitro*.

La complessità dell'embrione, dovuta alla

sua singolarità di essere "soggetto", permette di condurre uno studio del danno cellulare su linee diverse: embrionale e trofoblastica. Inoltre, l'embrione possiede regolazioni di differenziazione e sviluppo cellulare molto sottili, simili alle EST (*embryonic stem cells*) che vengono usate in altri protocolli di embriotossicità (3, 6-17). Il test ha mostrato la scarsa influenza del cemento a base Portland e dell' MTA (mineral trioxide aggregate) nello sviluppo degli embrioni, al contrario ha evidenziato una sensibilità selettiva nei confronti del controllo positivo (cemento a base di eugenato) e del controllo negativo (D-MEM).

BIBLIOGRAFIA

- Boyle P. Kronfeld's histopathology of the teeth and their surroundings structures. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1955.
- Borsuk HH. Bacterial status of the periapical radiolucent areas of endodontically involved teeth. Thesis. Boston Univ., School of Grad. Dent., 1974.
- Roussev RG, Stern JJ, Thorsell L, Thomason EJ, Coulam CB. Validation of an embryotoxicity assay. *Am J Reprod Immunol*, 1995; 33: 171-75.
- S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P. Gehron Robey, and S. Shi. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97 (25): 13625-13630.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100 (10): 5807-12.
- Thomason EJ, Roussev RG, Stern JJ, Coulam CB. Prevalence of embryotoxic factor in sera from women with unexplained recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol*, 1995; 34 :338-41.
- Kaider AS, Kaider BD, Janowicz PB, Roussev RG. Immunodiagnostic evaluation in women with reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42: 335-346.
- Sargent IL, Dokras A. Embryotoxicity as a marker for recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*, 1996; 35: 383-387.
- Eckler JL, Laufer MR, Hill JA. Measurement of embryotoxic factors is predictive of pregnancy outcome in women with a history of recurrent abortion. *Obstet Gynecol*, 1993; 81: 84-87.
- Brown, N.A. Selection of test chemicals for the ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Embryotoxicity Tests. *ATLA*, 2002; 30: 177-198.
- Genschow E, Spielmann H, Scholz G et al. The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Embryotoxicity Tests: results of the definitive phase and evaluation of Prediction Models. *ATLA*, 2002; 30: 151-176.
- Genschow E, Scholz G, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K, Spielmann H. Development of prediction models for three *in vitro* embryotoxicity tests in an ECVAM validation study. *In Vitro Mol. Toxicology*, 2000; 13(1): 51-66.
- Heuer J, Graeber IM, Pohl I, Spielmann H. Culture system for the differentiation of murine embryonic stem cells - a new approach to *in vitro* testing for embryotoxicity and for developmental immunotoxicology. *European Medicines Research. IOS Press; Amsterdam* 1994; 134-145.
- Heuer J, Graeber IM, Pohl I, Spielmann H. An *in vitro* embryotoxicity assay using the differentiation of embryonic mouse stem cells into haematopoietic cells. *Toxicol. in Vitro*, 1994; 8: 558-587.
- Newall DR, Beedles KE. The stem-cell test - a novel *in vitro* assay for teratogenic potential. *Toxicol In Vitro*, 1994; 8, 697-701.
- Scholz G, Genschow E, Pohl I, Bremer S, Paparella M, Raabe H, Southey J and Spielmann H. Prevalidation of the Embryonic Stem Cell Test (EST). A new *in vitro* Embryotoxicity Test. *Toxicology In Vitro*, 1999; 13, 675-681.
- Spielmann H, Pohl I, Döring B, Moldenhauer F. *In vitro* embryotoxicity assay using two permanent cell lines: mouse embryonic stem cells and 3T3 fibroblasts. Abstracts of the 23. ETS conference 1995, Dublin: *Teratology*, 1995; 51 (6): 31A-32A.