

# Tossicità di due sostanze chelanti mediante un sistema in vitro

*In vitro* toxicity test of two chelating substances

## ABSTRACT

We conducted an *in vitro* test to assess the chelating properties of two EDTA-based irrigation solutions widely used in Endodontics to remove the smear layer. The two solutions employed were LARGAL Ultra (Spécialités Septodont, Saint Maur, France) and RC-PREP (Medical Products Laboratories, Oral Pharmaceuticals Division, Philadelphia, PA, USA). Human gingival fibroblast cultures and human umbilical endothelial cell (HUVEC) cultures were exposed to M199 medium solutions containing concentrations of TITRIPLEX III (EDTA for biochemical, Merck, code #8418) in varying strengths of from 100 mM to 0.1 mM, for 24 hrs at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 100% humidity. A medium with PBS was used as a negative control solution.

To assess toxicity *in vitro*, we followed U. Landegren's method (1). Regarding the LARGAL Ultra solution, cell vitality of the fibroblasts in the wells containing 100 mM of EDTA-based TITRIPLEX III was 2.1% and 1-1.6% for the wells containing the HUVEC, a sign of strong chelating activity. The results showed a direct ratio between chelating activity and cytotoxicity.

The RC-PREP solution showed slight cytotoxicity and scarce chelating activity. LARGAL Ultra and TITRIPLEX III diluted to 100 mM of EDTA are cytotoxic and have considerable chelating activity.

**Key words:** Endodontics. Chelants.

mane (HUVEC) sono state messe a contatto per 24 ore a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% umidità, con medium M199 contenente concentrazioni scalari di TITRIPLEX III (EDTA per biochimica, Merck, n° cod. 8418) da 100 mM a 0,1 mM. Medium con PBS è stato utilizzato come controllo negativo. Per valutare la tossicità *in vitro* abbiamo utilizzato il metodo di U. Landegren (1). La vitalità cellulare dei fibroblasti nei pozzetti contenenti 100 mM finali di EDTA del Titrplex III, LARGAL Ultra era rispettivamente del 2,1% e nei pozzetti con HUVEC era del 1-1,6% segno di forte attività chelante. Da questi dati risulta una diretta proporzionalità tra azione chelante e citotossicità.

L'RC-PREP dimostra bassa citotossicità e scarsa attività chelante.

Il LARGAL Ultra e il TITRIPLEX III diluiti a 100 mM di EDTA sono citotossici ed hanno una notevole azione chelante.

**Parole chiave:** Endodonzia. Chelanti.

## INTRODUZIONE

Il fango dentinale si forma per l'azione di mezzi rotanti sui tessuti duri dentali. Il suo spessore e la sua composizione variano a seconda dei mezzi meccanici impiegati e della dentina operata. Il fango dentinale è organizzato in sub-unità globulari con un diametro di 0,05-1 µ formate da particelle di idrossilapatite immerse in un film organico di collagene gelatinoso il quale deriverebbe da diversi materiali organici come processi odontoblastici, cellule del sangue, detriti pulpari e/o batterici (2). In un'indagine condotta con SEM su superficie canalare strumentata, Mader e coll. (3) hanno dimostrato che il fango dentinale è organizzato in 2 modi: sulla superficie della dentina intertubulare con uno strato di 2µ e nei tubuli dentali con 2-40µ formato da particelle più fini e con aspetto digitiforme o tubulare segmentato.

In passato alcuni autori ritenevano che il fango dentinale servisse per ridurre la permeabilità dentinale ai batteri (4), Brannstrom e Nyborg (5) sostenevano che il fango dentinale potesse dare rifugio a microrganismi anaerobi costituendo un focolaio

cronico di sostanze dannose. Akpata e Blechman (6) dimostrarono che lo smear layer era permeabile a streptococchi e solubile a sostanze acide. Williams e Goldman (7) hanno dimostrato che il fango dentinale può solo rallentare il passaggio dei microrganismi nei tubuli dentali. Nel 1993 Nissan e coll. (8) hanno provato che i prodotti dei batteri come l'endotossina polisaccaridica (LPS) prodotta dall'*actinobacillus actinomycetes comitans* permeano con relativa facilità la dentina umana anche in presenza di fango dentinale.

Ostby (9) fu il primo che, riconoscendo la presenza di fango dentinale durante la strumentazione endodontica, utilizzò l'EDTA come soluzione irrigante chelante. Poi ci furono altri autori come Patterson (10), Mc Comb e Smith (2), Pashley (11), Brannstrom (5) che proposero soluzioni irriganti per rimuovere lo smear layer con ipoclorito di sodio al 2-5%, che ha una buona azione solo nella dissoluzione del materiale organico. Altre sostanze utilizzate sono: acido poliacrilico al 20%, che possiede una buona azione o l'acido citrico al 10%. Infine si sono proposti l'acido ortofosforico e l'acido maleico che causano la rapida scomparsa della componente peritubulare e provocano l'allargamento imbutiforme dei tubuli. Queste soluzioni acide presentano delle difficoltà nell'utilizzo per quanto concerne la diffusione e il tempo d'azione dell'acido stesso. Oggi l'irrigante che raccoglie i più vasti consensi (12-17) è l'EDTA associato all'ipoclorito di sodio, in quanto sembrerebbe che l'azione combinata dei 2 elementi porti alla rimozione del fango dentinale e del materiale organico durante la strumentazione endodontica.

## MATERIALI E METODI

In questo studio abbiamo utilizzato EDTA o acido etilendiaminotetracetico, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, che allo stato puro si presenta in polvere bianca cristallina, solubile in soluzioni acide e moderatamente in acqua. Abbiamo utilizzato tre preparati:

## RIASSUNTO

Con questo lavoro vogliamo valutare le proprietà chelanti, misurando la tossicità *in vitro*, di 2 soluzioni irriganti a base di EDTA, largamente utilizzate in Endodonzia per rimuovere il fango dentinale: LARGAL Ultra (Spécialités Septodont, Saint Maur, France) e RC-PREP (Medical Products Laboratories Oral Pharmaceuticals Division, Philadelphia, USA). Colture di fibroblasti gengivali umani e cellule endoteliali ombelicali u-

Gerosa R, Borin M, Cavalleri G. Tossicità di due sostanze chelanti mediante un sistema in vitro. *G It Endo* 1997; 1: 19-22

■ RC-PREP (Medical Products Laboratories Oral Pharmaceuticals Division Philadelphia, PA 19115 USA) presente in gel costituito da EDTA al 15% e perossido d'urea al 10%, base propilenico che presenta un pH=3,

■ LARGAL Ultra (Spécialités Septodont, 58 rue du Pont de Créteil, 94100 Saint Maur, France): disponibile in flaconi da 13 ml contenente EDTA, 15 g, cetrimide 0,75 g eccipienti q.b. a 100,

■ TITRIPLEX III (EDTA per biochimica - Merck, Germany) come controllo positivo. I tre prodotti sono stati diluiti a concentrazioni scalari per l'EDTA TITRIPLEX III e per il LARGAL Ultra a: 100 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, mentre per l'RC-PREP non è stato possibile ottenere concentrazioni di EDTA maggiori di 15 mM ed è stato testato a 0,1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM e 15 mM.

## COLTURE CELLULARI

I fibroblasti umani derivano da frammenti biotici gengivali, mentre le cellule endoteliali venose derivano da cordoni ombelicali umani. Entrambe le colture cellulari erano usate entro i 2-8 passaggi. Le flasche contenenti le cellule erano incubate a 37°C, 100% di umidità, con 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura era ricambiato ogni due giorni. Le cellule erano staccate dalle flasche con tripsina/EDTA 0,01% (SIGMA) e la tripsina era inattivata mediante diluizione con terreno di coltura. Le cellule erano piastrate a una concentrazione di 30000 cellule/cm<sup>2</sup> su piastre multi-pozzetto (9,6 cm<sup>2</sup>/pozzetto). Giunte a confluenza dopo 3 giorni, le cellule erano incubate con le soluzioni da testare per 24 ore.

## DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ

Per saggiare la sopravvivenza cellulare veniva determinata l'attività della esosaminidasi (EC 3.2.1.30), un enzima citosolico rilasciato dalle cellule in lisi, in accordo con il metodo di Landegren (17). In breve, per l'enzima esosaminidasi il substrato cromo- genico p-nitrofenolo-N-acetil-B-D-glucosaminidasi, veniva disciolto a 7,5 mM con 0,1 mM tampone citrato, a pH=5. La soluzione veniva mescolata con un egual volume di Triton X-100 0,5% in acqua ed aggiunto alle

cellule per 60' a 37°C. La reazione era bloccata aggiungendo glicina 50 mM, pH=10,4. L'assorbanza era misurata mediante un lettore di micropiastra BIO-RAD (modello 450, BIO-RAD Laboratories, Italia) a 450 nm. I risultati, espressi come percentuale di tossicità erano (E-S) X100/M-S, dove E rappresenta l'assorbanza media delle letture dei singoli pozzetti, S la media del rilascio spontaneo, ed M il massimo rilascio dopo lisi cellulare.

## RISULTATI

L'azione chelante dell'EDTA dei tre materiali è stata valutata indirettamente dal punto di vista biologico misurando la citotossicità, cioè la capacità di sottrarre ioni Ca<sup>++</sup>

dalle cellule e quindi di determinare la lisi cellulare delle colture. I risultati dell'esperimento sono rappresentati nelle tabelle 1 e 2 e nelle figure 1 e 2. I risultati tra i due differenti terreni di coltura cellulare sono analoghi. Come controllo negativo abbiamo utilizzato il medium e PBS (Phosphate Buffered Saline) e come controllo positivo EDTA puro diluito alle stesse concentrazioni del LARGAL Ultra ottenendo dei risultati sovrapponibili. A concentrazioni superiori di 100 mM di EDTA abbiamo avuto una totale morte cellulare. Per l'RC-PREP, anche modificando il pH da acido a basico per aumentare l'EDTA dissociato e quindi in forma attiva, non siamo riusciti ad ottenere concentrazioni superiori a 15 mM di EDTA perché il materiale precipitava. A queste concentrazioni il materiale non è risultato citotossico cioè incapace di azione chelante.

Percentuale di fibroblasti gengivali umani vitali a contatto per 24h con concentrazioni scalari di EDTA

EDTA mM	EDTA	LARGAL Ultra	RC-PREP
100	2	1	
10	96	38	100
1	99	88	100
0,1	97	95	100
0,01	100	98	100
0,001	100	100	100

Tab. 1

Percentuale di cellule endoteliali umane vitali a contatto per 24h con concentrazioni scalari di EDTA

EDTA mM	EDTA	LARGAL Ultra	RC-PREP
100	2	1	
10	95	26	100
1	98	80	100
0,1	99	85	100
0,01	100	96	100
0,001	99	99	100

Tab. 2



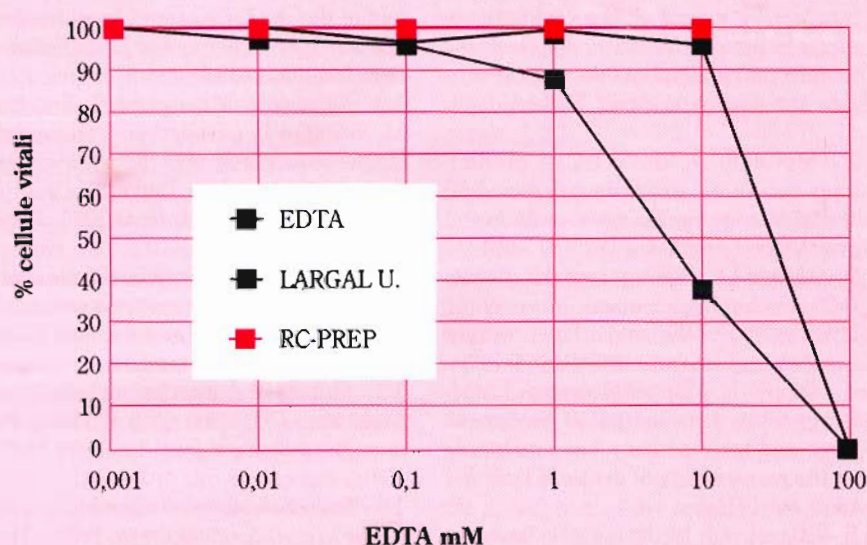
Citotossicità delle soluzioni da testare  
su fibroblasti gengivali umani

Fig. 1

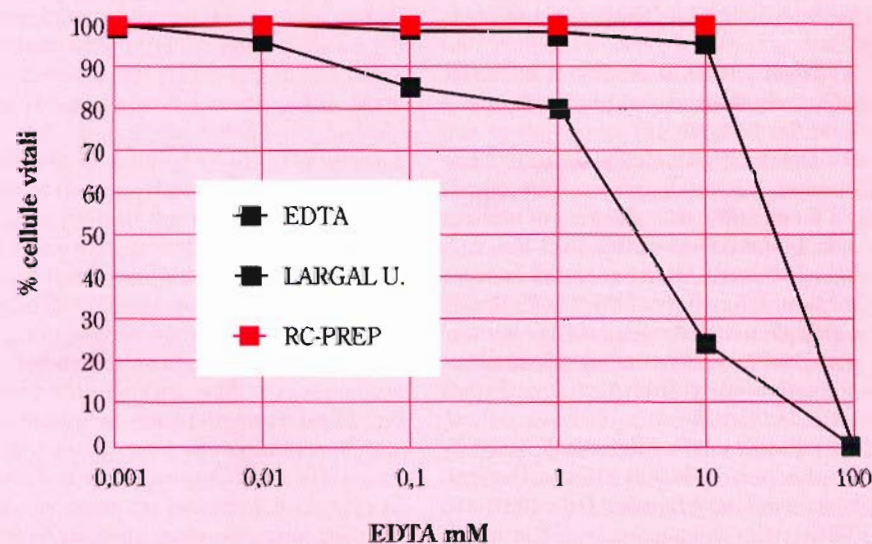
Citotossicità delle soluzioni da testare  
su cellule endoteliali umane

Fig. 2

## DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo valutato la capacità chelante di due soluzioni irriganti attraverso un sistema biologico. Abbiamo valutato la diretta proporzionalità tra citotossicità e azione chelante fondata sul principio che sottraendo ioni  $\text{Ca}^{++}$  alle cellule abbiamo un'alterazione ionica intra-extracellulare con conseguente morte cellulare.

Come controllo abbiamo utilizzato medium e PBS. Dai risultati del nostro studio si è provato che soluzioni di 100 mM di EDTA sono citotossici cioè capaci di attività chelante. Tali concentrazioni sono state ottenute dal LARGAL Ultra e dal EDTA TITRIPLEX III. Per l'RC-PREP i risultati sono stati insoddisfacenti. Il LARGAL Ultra ed il TITRIPLEX III sono chelanti, mentre l'RC-PREP rappresenta un "lubrificante". Il LARGAL Ultra fornito in flaconi contiene una concentrazione attiva di EDTA di 400 mM ad un pH=7,5 che gli permette una notevole azione chelante sulle pareti dentinali. Inoltre contiene anche la cetrimide, un detergente che agendo sulla matrice organica permette un contatto diretto dell'EDTA sulla componente inorganica dentinale. Per l'RC-PREP invece la concentrazione di EDTA che agisce sulle pareti dentinali è di 15 mM, una concentrazione che non è risultata citotossica cioè incapace di azione chelante. Inoltre nella situazione clinica abbiamo la formazione sulla superficie radicolare di una trama tridimensionale di materiale organico che impedisce il contatto diretto dell'EDTA con la componente inorganica e determina una formazione di complessi di acido-base e sali che si depositano sulla superficie radicolare.

Questo lavoro conferma i dati ottenuti nello studio svolto in precedenza (12) nel quale avevamo valutato l'attività chelante di queste due soluzioni irriganti dal punto di vista chimico-fisico. I risultati del nostro studio sono in accordo con quelli di Patterson (9), di Shibata (14) e di Yamaguchi (16), i quali hanno valutato l'azione chelante dell'EDTA e dell'acido citrico misurandone l'attività antimicrobica. L'EDTA ha dimostrato un'attività antimicrobica a 0,5 M mentre l'acido ci-

trico a 1-2 M. I nostri dati sono in disaccordo con quelli di Ando (15), probabilmente per i differenti metodi, i diversi terreni cellulari e le diverse valutazioni dell'azione chelante.

## CONCLUSIONI

L'uso di chelanti in Endodonzia è utile perché rimuove lo smear layer, che si forma durante la strumentazione, permette l'alesatura di canali atresici o con formazioni calcifiche, permette alle paste medicamentose di passare attraverso i tubuli dentinali ed esprimere una funzione più completa e soprattutto perché a fine strumentazione si ottengono delle pareti dentinali che sono prive di smear layer.

Infine si consiglia di associare la tecnica crown-down che permette di formare una specie di serbatoio che mantiene sempre attiva la soluzione irrigante nella zona apicale.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - Landegren U. Measurement of cell number by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods* 1984; 67: 379-88
- 2 - McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endodon* 1975; 1: 238-42
- 3 - Mader LL, Baumgarten JC, Peters DD. A scanning electron microscopic investigation of the smear layer on root canal walls. *J Endodon* 1984; 10: 447-83
- 4 - Dippel H, Hoppenbrouwers PMM, Borggreven J. Influence of the smear layer and intermediary base materials on the permeability of dentin. *J Dent Res* 1981; 60: 1211-5
- 5 - Brannstrom M, Nyborg H. Bacterial growth and pulpar changes under inlays cemented with zinc phosphate and e-poxylate CBA 9080. *J Prosthet Dent* 1974; 31: 556-65
- 6 - Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpar dentin wall *in vitro*. *J Dent Res* 1982; 61: 435-8
- 7 - Williams S, Goldman M. Penetrability of the smeared layer by a strain of *Proteus Vulgaris*. *J Endodon* 1985; 11: 385-8
- 8 - Nissan R, et al. Ability of bacterial endotoxin to permeate human dentin. *J Dent Res* 1993; 92: 127
- 9 - Ostby BN. Chelation in root canal therapy. Ethylenediamine tetra-acetic acid for cleaning and widening of root canals. *Odontol Tidskr* 1957; 65: 3-11
- 10 - Patterson SS. *In vivo* and *in vitro* studies of the effect of the disodium salt of ethylenediaminetetraacetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963; 16: 83-103
- 11 - Pashley DH, Michelin V, Kehl T. Dentin permeability: effect of smear layer removal. *J Prosthet Dent* 1981; 46: 531-7
- 12 - Goldman M, Devitre R, Pier M. Effect of the dentin smeared layer on tensile strength of cemented post. *Prosthet Dent* 1984; 52: 485-8
- 13 - Gerosa R, Menegazzi G, Ferraro M, Valentini L, Cavalleri G. Utilizzo della spettroscopia in assorbimento atomico per la valutazione dell'efficacia di 2 sostanze chelanti. *G It Endo* 1996; 3: 96-100
- 14 - Aktener BO, Bikay U. Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. *J Endodon* 1993; 19: 228-31
- 15 - Shibata T. A foundational study on root canal irrigation with EDTA solution. *Jpn J Conserv Dent* 1990; 33: 1085-101
- 16 - Ando F. A study on chemical preparation in endodontic therapy. Part I. The effect of EDTA on powdered dentin and dentinal walls. *Aichi Gaukin J Dent Sci* 1985; 23: 448-54
- 17 - Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Irrigation of the radicular canal by citric acid solution. *J Endodon* 1996; 22: 154-8