

*Roberto Gerosa
 *Marco Borin
 *Gianluca Menegazzi
 *Fiorenzo Faccioni
 **Giacomo Cavalleri

*Clinica Odontoiatrica
 Università degli Studi di Verona
 Direttore: Prof. Paolo Gotte

**Università degli Studi di Ferrara
 Corso di Laurea in Odontoiatria
 Direttore: Prof. Giorgio Calura
 Cattedra di Parodontologia
 Titolare: Prof. Giacomo Cavalleri

Un metodo di valutazione della citotossicità relativa dei materiali da otturazione canalare su colture di fibroblasti umani

An method for evaluation of cytotoxicity of endodontic filling materials on human gingival fibroblasts

RIASSUNTO

Nella odierna pratica endodontica vengono utilizzati in associazione alla guttaperca differenti cementi endodontici, tutti raccomandati come atossici dalle case produttrici. Per valutare il grado di biocompatibilità di tali cementi endodontici, rispetto ai tessuti periapicali, sono stati realizzati metodi sia *in vivo* che *in vitro*, come si può osservare da un'ampia rassegna bibliografica (1-19). Nel nostro studio abbiamo utilizzato un semplice metodo *in vitro* per testare la tossicità dei materiali da otturazione canalare. Il protocollo prevede la determinazione spettrofotometrica della citotossicità su fibroblasti gengivali umani utilizzando un substrato cromogeno che reagisce con un enzima lisosomiale coinvolto nella degradazione cellulare.

Parole chiave: Cementi endodontici. Tossicità. Biocompatibilità.

SUMMARY

Different endodontic cements, all recommended as biocompatibility by producing factory, associated with guttapercha are usually used in endodontic practice. In many references are reported *in vivo* and *in vitro* tests that were used to evaluate the biocompatibility of endodontic cements to periapical tissues. In our study we have prepared a simple experimental procedure that evaluates the cytotoxicity of endodontic filling materials using cellular cultures of human gingival fibroblasts. In order to determine the cytotoxicity and cellular enzyme of the cellular degradation reacts with the chromogenic substrate to produce a yellow colour which measured spectrophotometrically at 405 nm.

Key words: Endodontic materials. Toxicity. Biocompatibility.

Corrispondenza:

Dr. Roberto Gerosa
 Clinica Odontoiatrica
 Università degli Studi di Verona
 37134 Verona - Via delle Menegonne
 Tel. 045/8074251 - Fax 045/8202142

Gerosa M, Borin M, Menegazzi G, Faccioni F, Cavalleri G. Un metodo di valutazione della citotossicità relativa dei materiali da otturazione canalare su colture di fibroblasti umani. *G It Endo* 1993; 3: 128-132

INTRODUZIONE

La biocompatibilità dei cementi endodontici è una problematica molto avvertita nella moderna Endodonzia data la notevole frequenza con cui i cementi endodontici vengono a contatto con i tessuti periapicali durante l'esecuzione di una terapia canalare. Al fine di valutare la biocompatibilità di un materiale non ci si può affidare soltanto al risultato delle esperienze di carattere clinico perché sono condizionate da molteplici fattori sistemici e locali che ne alterano il risultato. Differenti metodi sono stati sviluppati per determinare la biocompatibilità dei cementi endodontici. Essi si dividono tradizionalmente in metodi *in vivo* e *in vitro* (1-5). I test *in vitro* sono denominati test primari perché vengono utilizzati per un primo screening dei materiali. I test *in vivo* sono chiamati secondari perché vengono utilizzati solo dopo che i materiali hanno dato esito positivo con i test *in vitro*.

Metodi *in vivo* (6-9).

Tre sono i metodi *in vivo* più comunemente utilizzati: reazione sistemica acuta, risposta all'immissione e risposta a lungo termine.

Il test all'immissione è quello preferito e valuta su animali da esperimento la reazione tissutale dei cementi endodontici posti in siti d'impianto che possono essere: osso mascellare, tibia, sottomucosa, periapice radicolare. Con il metodo *in vivo* parecchi fattori come il controllo dell'operatore, il trauma sperimentale, variazioni ed errori della diagnosi preoperatoria, infezioni nascoste o non controllate e risposte dell'ospite alterano i risultati e ne confondono l'interpretazione (2,5,6,7).

Metodi *in vitro* (8-14)

Con il metodo *in vitro* si determina la tossicità dei materiali su colture cellulari. Con questo metodo possiamo controllare completamente la situazione sperimentale ottenendo una maggiore obiettività dei risultati inoltre possiamo variare la condizione sperimentale modificandone i fattori. Le colture cellulari sono d'altro canto estremamente sensibili. La sensibilità di un certo tipo cellulare ai cambiamenti citotossici è marcata-

mente influenzata da: ambiente *in vitro*, i nutrienti, il siero contenuto nel medium, il pH e la temperatura d'incubazione (9).

Quindi le risposte cellulari possono essere influenzate sia dalla tecnica e dal medium impiegato e sia dalla differenza tra i vari tipi cellulari. Alcuni articoli precedenti hanno enfatizzato che l'elevato costo e la difficoltà al mantenimento delle colture delle cellule umane diploidi ne impedisce un loro largo utilizzo nei test *in vitro*. In questi ultimi anni sono stati pubblicati vari metodi per lo sviluppo ed il mantenimento di colture di cellule umane diploidi (17,18). Con le colture cellulari studi a lungo termine sono molto difficili da realizzare perché le cellule muoiono non possedendo meccanismi di guarigione. Inoltre non è possibile mettere direttamente a contatto le cellule con il materiale da testare. Nel passato le cellule più spesso utilizzate sono state le cellule HeLa (2,5,6,7). Queste cellule e le cellule trasformate posseggono proprietà biologiche differenti dalle normali cellule diploidi e possono di conseguenza dare delle risposte cellulari diverse (9). Alcuni ricercatori

hanno accentrato la loro attenzione su questo problema dimostrando delle differenze significative nella risposta biologica tra cellule trasformate e cellule umane diploidi. I test *in vitro* più comunemente utilizzati sono tre: il "filter method", che utilizza un disco di filtro millipore (2,4,5,6); un metodo che valuta la tossicità dei cementi studiando l'attaccamento cellulare sulla superficie del materiale; infine il "Radiochrominm release method" una procedura che misura la tossicità attraverso il rilascio di Cr radioattivo dalle cellule premarche di colture messe a contatto con il cemento endodontico (4,13). I metodi *in vitro* per misurare la citotossicità dei materiali endodontici sono stati raccomandati da Spangberg (15) e da Arenholt-Bindslev (9). Nel nostro protocollo sperimentale *in vitro* sono stati utilizzati fibroblasti gengivali umani, perchè sono facilmente riproducibili (17,18), inoltre avendo un'origine tissutale comune con i fibroblasti del parodonto profondo, il loro comportamento è quello che, rispetto alle altre linee cellulari, si avvicina di più all'ambiente periapicale (12). Scopo del nostro studio è stato di sviluppare un protocollo sperimentale per la determinazione della citotossicità dei cementi endodontici misurando l'enzima N-acetil- β -esosaminidasi che partecipa alla degradazione cellulare. Questo enzima legato con il substrato NAG cromogeno sviluppa una colorazione gialla che quantificata spettrofotometricamente misura la quantità di fibroblasti gengivali umani vivi rispetto al controllo (19).

MATERIALI E METODI

Il nostro protocollo sperimentale è suddiviso in 4 parti:

Tubi-test

Tubi standardizzati di polietilene come raccomandato dall'FDI per il test all'immissione sottocutanea sono stati utilizzati per questo protocollo sperimentale. I tubi dal diametro di 2,5 mm sono stati tagliati a pezzi di 4 mm di lunghezza.

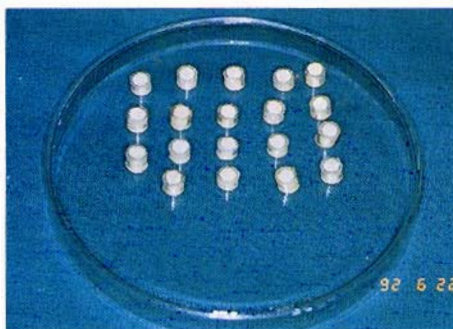


Fig. 1 - Campioni di un cemento endodontico.

Preparazione dei campioni e delle soluzioni-test

In questo studio per valutare l'efficacia del protocollo sperimentale sono utilizzati 3 cementi endodontici: un cemento all'ossido di zinco ed eugenolo che indicheremo con A, un cemento con idrossiapatite che indicheremo con B e un cemento resinoso che indicheremo con C. Come controllo sono utilizzati sia PBS (phosphate buffered saline) che i tubi test.

I cementi sono mescolati secondo le istruzioni dei fabbricanti e posti nei tubi-test (Fig. 1). Dopo 48h l'operazione di riempimento viene ripetuta per compensare la contrazione avvenuta nell'indurimento. Le superfici superiore e inferiore del cemento contenuto nei campioni sono lisciate e lucidate con dischi Pop-On a grana fine usati su manipolo a bassa velocità. Si ottengono così 30 campioni per ciascun cemento endodontico aventi la stessa superficie di esposizione e la stessa massa. Viene testata anche la citotossicità dei tubi-test.

Tutti i campioni, tubi-test compresi, sono sterilizzati per 48h a 37°C con ossido di etilene. Per rimuovere completamente i residui gassosi i campioni sono areati per 72h. Ciascun gruppo di 30 campioni è messo a contatto con 30 ml di tampone Fosfato-Salino (PBS) per 1 settimana in termostato a 37°C con 100% di umidità. Il PBS è preparato con 137mM di NaCl, 2mM di KCl, 4mM di Na_2HPO_4 , 1,7 mM di KH_2PO_4 a pH 7,25. Al termine della prima settimana i campioni sono centrifugati; il supernatante prelevato

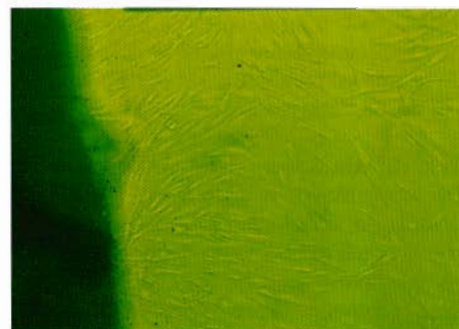


Fig. 2 - Crescita dei fibroblasti gengivali umani dai margini del frammento biotico.

costituisce la soluzione-test che viene utilizzata per la determinazione della citotossicità. Tutti i campioni suddivisi sempre allo stesso modo sono nuovamente posti in 30 ml di PBS fresco e lasciati per un'altra settimana ripetendo la procedura su descritta. In tal modo si ricava la soluzione-test di ogni cemento endodontico e dei tubi-test della prima e della seconda settimana.

Il 20% di ciascuna di queste soluzioni-test viene prelevata e viene trasferita in piastre da 24 pozzetti contenenti i fibroblasti ad una concentrazione di $10^4 \pm 3$ cell/ml/pozzetto (area 2 cm²) ed incubate a 37°C, 100% umidità per 24/48/72 ore.

Culture cellulari

I fibroblasti umani derivano da frammenti biotici gengivali lasciati incubare in flascche da 25 cm² con medium DME (Dulbecco's modified Eagle's medium, terreno di coltura) contenente: 1 gr/L di glucosio, 10% di FCS, 3,7 gr/L di NaHCO_3 , 25mM di HEPES (soluzione tampone), 2% di glutamina, 0,11 gr/L di acido pinivico, 0,05 mg/L di Gentamicina (Sigma G 1272), 2,5 mg/L di Amphotericina B.

Trascorsi 7-10 gg, ai margini del frammento biotico si evidenziano la crescita di fibroblasti e diverse altre cellule (Fig. 2).

I fibroblasti vengono selezionati nel corso dei vari passaggi di distacco cellulare con tripsina (Fig. 3).

Dopo la opportuna espansione cellulare (VII passaggio), raggiunta la confluenza, i fibroblasti sono trasferiti in piastre da 24



Fig. 3 - Fibroblasti gengivali umani a confluenza raggiunta (VII passaggio).

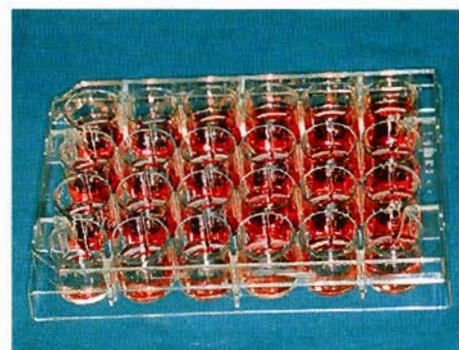


Fig. 4 - Piastre da 24 pozzetti contenenti i fibroblasti e le soluzioni da testare.

pozzetti (Fig. 4) ad una concentrazione di $10E+3$ cell/ml/pozzetto (area 2 cm^2) in medium contenente il 20% della soluzione da testare ed incubate a 37°C , 100% umidità per 24/48/72 ore.

Test di valutazione della citotossicità

Per determinare la citotossicità (in questo protocollo si determina la percentuale di cellule vitali di ciascun cemento endodontico in rapporto a quelle del controllo) si utilizza l'enzima cellulare N-acetil- β -esosaminidasi (EC 3.2.1.30), un enzima lisosomiale che è coinvolto nella degradazione dei costituenti glicosilati cellulari. La soluzione di substrato cromogeno costituita da: 3,75mM di p-nitrofenolo-N-acetil- β -D-glucosamide (NAG) in tampone citrato 0,05M, contenente 0,25% di detergente Triton X-100, a pH 5, reagisce con l'enzima e a pH 10,50 sviluppa una colorazione gialla che viene quantificata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 405nm (Ulf Landegren J, Immunol Meth 67; 1984, 379-388). Dopo 24/48/72 ore di incubazione a 37°C , 5% CO_2 , 100% di umidità, i pozzetti sono lavati 3 volte con PBS per eliminare le cellule eventualmente morte e vengono aggiunti 400 μl di substrato cromogeno NAG. Dopo 3h di incubazione a 37°C e 100% di umidità, 100 μl delle soluzioni cellulari contenute nei pozzetti sono trasferite in una micropiastre da 96 pozzetti (Fig. 5). Bloccata la reazione con 100 μl di soluzione tampone a pH 10,50 contenente: 250mM di Glicina, 10mM di EDTA, viene misurata l'assorbanza con un lettore di micropiastre BIO-RAD 450 a una lunghezza d'onda di 405 nm. Questa procedura viene eseguita per tutte le soluzioni-test della prima e della seconda settimana. La reazione tra enzima e substrato sviluppa a pH 10,50 dato dal tampone glicina, una colorazione gialla che misurata spettrofotometricamente quantifica la percentuale di fibroblasti vitali dei cementi endodontici rispetto a quelli del controllo. L'assorbanza, quindi, è direttamente proporzionale alla quantità di cellule vive rispetto al controllo. Da sottolineare che il coefficiente di variazione del metodo è risultato dell'8,9%. Inoltre le colture di fibroblasti umani sono state osservate con il microscopio a inversione per osservare sia la crescita dei fibroblasti

dal frammento biotico e sia la risposta morfologica cellulare dei fibroblasti a contatto con le soluzioni-test dei cementi endodontici.

RISULTATI

Il nostro protocollo sperimentale è risultato con un coefficiente di variazione dell'8,9%, valore che indica una bassa dispersione dei dati ottenuti.



Fig. 5 - Micropiastre da 96 pozzetti contenenti il substrato cromogeno e i fibroblasti dopo incubazione con le soluzioni test.

Tab. 1 - Percentuale dei fibroblasti vitali dei cementi endodontici della I e II settimana.

Cementi	I Settimana			II Settimana		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
A	100	88,4	73,9	100	100	93,02
B	5,1	0,17	0,16	25,2	14,5	6,79
C	35,4	5,1	2,2	8,8	1,5	2,2
Teflon	100	100	100	100	100	100
PBS	100	100	100	100	100	100

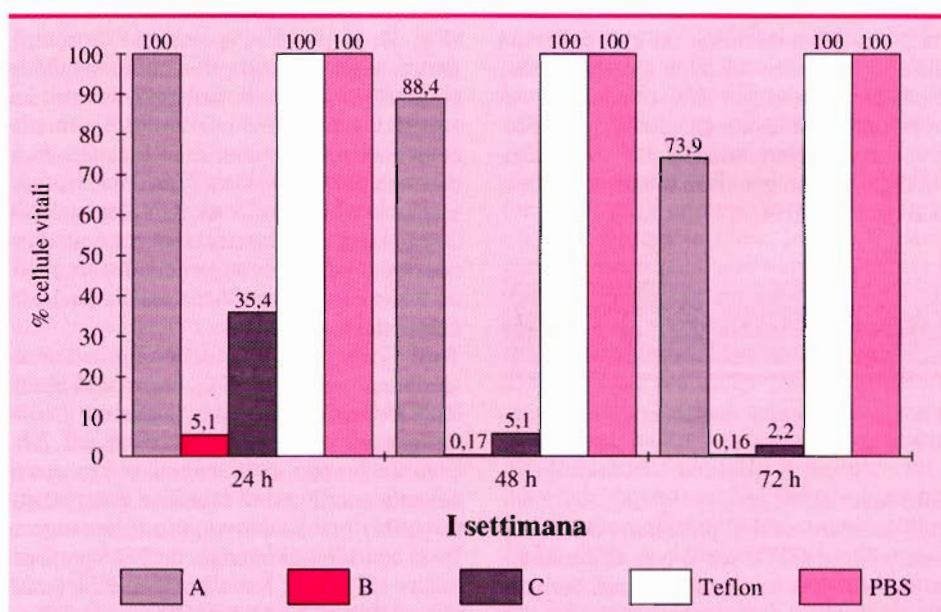


Fig. 6 - Istogramma della percentuale di fibroblasti vitali dei cementi endodontici dopo 1 settimana.

I tubi-test di teflon ed il PBS, utilizzati entrambi come controllo, hanno dato una compatibilità pari al 100% di cellule vitali. Tutte le soluzioni-test dei cementi provati, tranne il C, sono migliorate nella seconda settimana registrando valori di percentuale di cellule vitali superiori rispetto alla prima settimana (Tab. 1 - Figg. 6-7).

Inoltre ogni pozzetto è stato valutato con il microscopio a inversione osservando le alterazioni della morfologia cellulare dei fibroblasti provocate dalla tossicità dei cementi endodontici. Nelle colture del cemento A dopo 24h ci sono tutti i fibroblasti vivi (Fig. 8). Per il cemento B c'è stata addirittura una totale moria delle cellule (Fig. 9). Infine in quelle del cemento C diluito al 50%, a 24h abbiamo la formazione di sincizi, segno di una alterazione morfologica cellulare e dimostrazione di una evidente citotossicità dei componenti del cemento (Fig. 10). Questo studio dimostra la validità del nostro protocollo sperimentale che permette di misurare la tossicità dei materiali in molteplici condizioni, osservare al microscopio la risposta cellulare delle colture cellulari ed è infine di facile ripetitività. I risultati ottenuti da questo studio trovano analogie con quelli esposti da: Nakamura H. e all. (11), Arenholt-Bindslev D. e all. (9). Si ribadisce la validità dei test *in vitro* rispetto ai test *in vivo* per la determinazione della tossicità dei materiali odontoiatrici e più precisamente per quelli da obturazione canalare.

DISCUSSIONE

Il protocollo sperimentale *in vitro* che abbiamo realizzato permette di determinare la citotossicità dei materiali da obturazione endodontici. Con questo studio lo stesso materiale campione può essere valutato in molteplici condizioni, le colture cellulari possono essere osservate al microscopio e infine l'esperimento è di facile ripetitività. Nel nostro studio i cementi endodontici sono stati valutati allo stato solido. Molto interessante sarebbe valutare la citotossicità dei cementi endodontici miscelati freschi perchè è in questo stato che presentano una elevata tossicità, ed è in questa situazione che

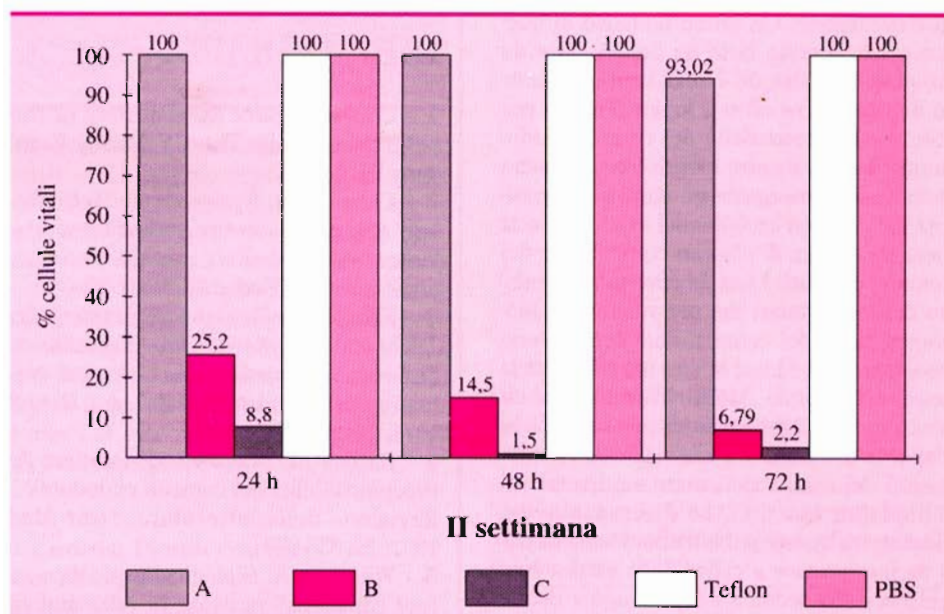


Fig. 7 - Istogramma della percentuale di fibroblasti vitali dei cementi endodontici dopo 2 settimane.



Fig. 8 - Fibroblasti vivi a contatto con il cemento endodontico A dopo 24h.



Fig. 9 - Totale moria dei fibroblasti a contatto con il cemento endodontico B dopo 24h.

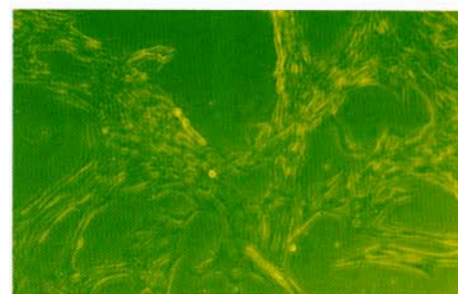


Fig. 10 - Fibroblasti a contatto con il cemento endodontico C diluito al 50% dopo 24h presentano formazioni sinciziali (sofferenza cellulare).

entrano a contatto con i tessuti periapicali nella pratica clinica. Un metodo *in vitro* che permetta di valutare la citotossicità di un cemento endodontico fresco a contatto con le cellule della coltura è difficile da realizzare perchè abbiamo la diffusione del cemento sulla coltura e una moria cellulare immediata per l'elevata tossicità del cemento fresco. Inoltre poichè l'indurimento del cemento endodontico avviene nel canale radicolare a contatto con i tessuti periapicali sarebbe utile testare la citotossicità del cemento endodontico mentre indurisce in quanto le sue caratteristiche biologiche sono in conti-

nua evoluzione. Un primo tentativo in questo senso è stato fatto da Safavi (7) e da Arenholt-Bindslev (9) i quali hanno realizzato dei metodi *in vitro* a lungo termine per valutare la citotossicità dei cementi endodontici freschi mentre induriscono. È nostra intenzione proseguire gli studi sulla tossicità dei cementi endodontici esaminando la capacità tossica di ciascun componente dei cementi canalari. I test *in vitro* rappresentano dei test primari ma per valutare la biocompatibilità dei cementi endodontici sono necessari anche i test *in vivo* per misurare la reazione tissutale. Molti ricercatori hanno usato metodi istopatologici per studiare la risposta tissutale dei materiali da riempimento del canale radicolare su diversi siti d'impianto (2,5,6,7). Le discrepanze dei risultati tra queste pubblicazioni sono difficili da interpretare a causa della natura soggettiva della tecnica istopatologica usata, dall'uso di differenti siti d'impianto e di differenti animali da esperimento, dal periodo d'osservazione e dai criteri usati per la valutazione (2,5). Resta comunque il fatto che le conoscenze riguardanti la citotossicità dei cementi endodontici ottenute con i metodi *in vitro* rappresentano un notevole passo in avanti per realizzare dei materiali da otturazione del canale radicolare completamente inerti.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Cohen S, Burs RC. Pathway of the pulp. Saint Louis: The CV Mosby Company Publ, 1976
- 2 - Cotton WR. Symposium. Methodology and criteria in the evaluation of biologic effects of dental materials. Introductory remarks. *J Endod* 1978; 10: 295-315
- 3 - Federation Dentaire Internationale: Technical report n°9-1980 "Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials". *Int Dent J* 1974; 24: 235-250
- 4 - Barone M, Malpassi M, Cantiero A. Biocompatibilità dei cementi endodontici. Revisione della letteratura. *Dent Mod* 1992; 25: 935-938
- 5 - Wennerg A. Biological evaluation of root canal sealers using *in vitro* and *in vivo* methods. *J Endod* 1980; 10: 784-787
- 6 - Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981; 8: 355-369
- 7 - Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Introsseous implantation for biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981; 6: 253-265
- 8 - Fonzi L, Gasparoni A, Capezzuoli L, Carboncini S, Belli M, Kaitsas V. Considerazioni su prove di biocompatibilità *in vitro* ed *in vivo* di alcuni cementi endodontici. *G It Endo* 1991; 3: 70-78
- 9 - Arenholt-Bindslev D, Horsted-Bindslev P. A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 219-226
- 10 - Safavi KE, Spangberg L, Costa N, Sapounas G. An *in vitro* method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontics sealers. *J Endod* 1989; 10: 484-486
- 11 - Nakamura H, Sakakibara F, Matsumoto Y. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. *J Endod* 1986; 4: 156-160
- 12 - Briseno BM, Willershasun B. Root canal on human gingival fibroblast. I. Zinc oxide-eugenol-based sealers. *J Endod* 1990; 8: 383-386
- 13 - Spangberg L, Al-Nazhan SA. The radiocromium release method for evaluation of cytotoxicity *in vitro*. *J Endod* 1988; 21: 72-78
- 14 - Safavi KE, Spangberg L, Sapounas G, Mac Alister TJ. *In vitro* evaluation of biocompatibility and marginal adaptation of root retrofilling materials. *J Endod* 1988; 11: 538-542
- 15 - Pascon E, Spangberg L. *In vitro* cytotoxicity of root canal filling materials: gutta-percha. *J Endod* 1990; 9: 429-433
- 16 - Al Nazhan SA, Sapounas G, Spangberg L. *In vitro* study of the toxicity of a composite resin, silver amalgam, and Cavit. *J Endod* 1988; 14: 236-238
- 17 - Ragnarson B, Carr G, Daniel JC. Isolation and growth of human periodontal ligament, cells *in vitro*. *J Dent Res* 1986; 64: 1026-1030
- 18 - Arenholt-Bindslev D, Jepsen A, Macallum DK, Lillie J. The growth and structure of human oral Keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 314-319
- 19 - 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: 379-388