

# Analisi in vitro della citotossicità di materiali compositi per protesi "metal-free"

Paolo Pera, Enrico Conserva, Anna Acquaviva, Eleonora Giuria, Gianluigi Mariottini, Luigi Pane, Silvano Valente

Le sempre più frequenti richieste estetiche da parte dei pazienti hanno portato l'odontoiatria attuale ad utilizzare, soprattutto in campo protesico, materiali altamente tecnologici ed affidabili, da un punto di vista fisico-meccanico, prodotti dall'industria a tal scopo e soprattutto ad un sempre minor uso di sottostrutture metalliche. Ma tali materiali, sia essi compositi o ceramici sono anche biocompatibili e cioè biointegrabili con i tessuti dentari e parodontali? Scopo di questa ricerca sperimentale è stato quello di valutare in vitro il grado di citotossicità di sei materiali compositi ad uso protesico "metal-free" e precisamente: Gradia, Estenia, Targis, Diamond Crown, Dei Clever Reply e Sculpture. I materiali sono stati testati seguendo la normativa ISO 10993, eseguendo il test di citotossicità in vitro con l'utilizzo di cellule di topo, fibroblasti L929 (isolati da tessuto muscolare) e coltivati in un terreno di crescita idoneo.

L'originalità di questa ricerca, sta nel fatto che i sei compositi presi in esame, sono stati posti nelle medesime condizioni; ossia il test di citotossicità è stato eseguito su questi materiali in modo contemporaneo, nel medesimo periodo, nelle stesse condizioni di temperatura e umidità, dallo stesso operatore. Inoltre i materiali testati sono stati preparati e utilizzati secondo un protocollo clinical use e cioè preparati direttamente e secondo le indicazioni dalle case produttrici e quindi rifiniti e lucidati con sequenza standard da un unico laboratorio odontotecnico. Tutti i materiali testati hanno dimostrato una scarsa o nulla citotossicità.

**Parole chiave:** Compositi; Citotossicità; Metal-free.

## Introduzione

Per la valutazione biologica dei materiali dentari sono stati proposti più test di controllo da vari Enti di Normalizzazione.

Il più importante principio dei test di biocompatibilità è che ogni materiale deve essere testato nello stato in

cui s'intende usarlo (clinical use). Poiché i materiali ad uso odontoiatrico sono in continuo aumento ed evoluzione, diviene sempre più importante evitare la commercializzazione di prodotti inadeguati.

La maggior parte delle ditte produttrici attua un esteso programma di valutazione qualitativa dei nuovi materiali, normalmente in cooperazione con reparti univer-

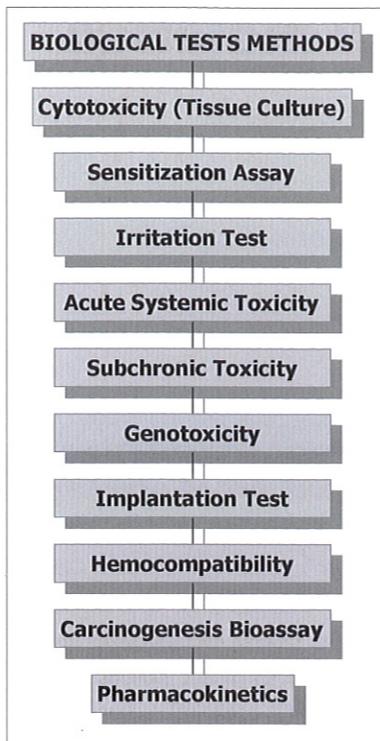


Grafico 1 Principali test biologici per la valutazione della citotossicità dei materiali secondo DF Williams (Techniques of biocompatibility testing, 1986).

sitari e ospedalieri, prima di permettere che un prodotto sia usato nella pratica corrente.

Gli Enti di Normalizzazione, per la valutazione di qualità utilizzano sia prove di laboratorio o in vitro sia cliniche o in vivo. Idealmente, un materiale dovrebbe essere atossico, non danneggiare, a breve o a lungo termine, né i tessuti con cui è in contatto, né quelli vicini, né ancora lo stato di salute generale dell'individuo; dovrebbe, inoltre, essere privo d'azioni tossiche, irritanti, infiammatorie, allergeniche, mutagene e carcinogenetiche non solo per il paziente, ma anche per chi s'interessa della sua produzione e manipolazione<sup>1</sup>.

Lo studio di un nuovo materiale, che dovrà essere inserito nell'ambiente orale, non può prescindere da una serie di valutazioni delle proprietà biologiche, mediante test che evidenziano, sia in vitro sia in vivo<sup>2,3</sup>, le sue caratteristiche e il comportamento, al fine di sfruttare appieno i vantaggi e minimizzare il rischio di reazioni sfavorevoli (Grafico 1). L'esecuzione di questi studi deve, inoltre, seguire i corretti protocolli, proposti e integrati negli anni dai numerosi organismi internazionali (O.M.S., F.D.I., A.D.A., I.S.O.) tramite i quali è oggi possibile standardizzare le terminologie, le specifiche e le metodiche di valutazione dei materiali dentali.

Scopo di questa ricerca sperimentale è stato quello di valutare in vitro il grado di citotossicità<sup>4,5</sup> di sei materiali compositi ad uso protesico metal-free e precisamente: Gradia (GC), Estenia (Kuraray), Targis (Ivoclar), Diamond Crown (DRM), Dei Clever Reply (Dei-Italia) e Sculpture (Pentron).

## Materiali e metodi

I materiali compositi da testare sono stati preparati direttamente dalle case produttrici in dischi di 10 mm di diametro e 3 mm di spessore come previsto dalla normativa ISO-10993 (Materiale: Enamel, shade A3). Sono stati successivamente rifiniti e lucidati da un unico operatore odontotecnico con procedura standardizzata:

- 1° step: fresa Komet cilindrica (CT H129UK 104 023) a giri 100.000 min<sup>-1</sup>;
- 2° step: gommino per lucidatura Komet brown (9610 104 045) a giri 6000 min<sup>-1</sup>;
- 3° step: gommino per brillantatura Komet green (9620 104 045) a giri 6000 min<sup>-1</sup>;
- 4° step: spazzolino setola naturale Komet (9638 900 220) a giri 6000 min<sup>-1</sup> + pasta lucidante per resine (Dentaurum);
- 5° step: moscione cotone Komet (9448 900 220) a giri 6000 min<sup>-1</sup>.

Per ogni campione è sempre stato utilizzato un set di frese nuovo (Fig. 1).

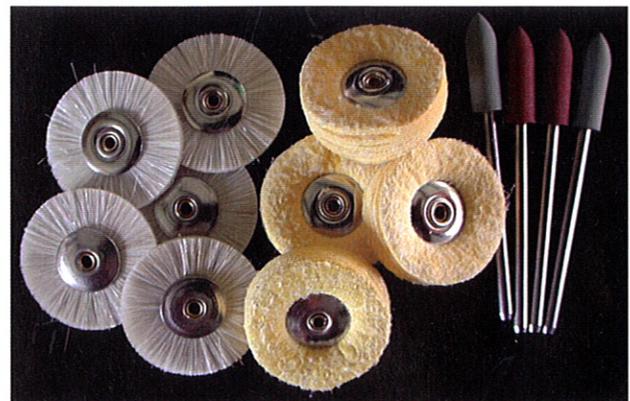


Fig. 1 Set di frese utilizzato per la lucidatura e la brillantatura dei campioni: per ogni campione è stato sempre utilizzato un set nuovo.

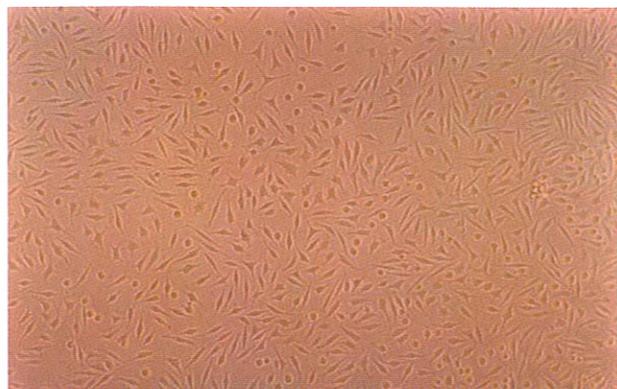


Fig. 2 Cellule di fibroblasti di topo L-929 ottenute da linee cellulari stabilizzate.

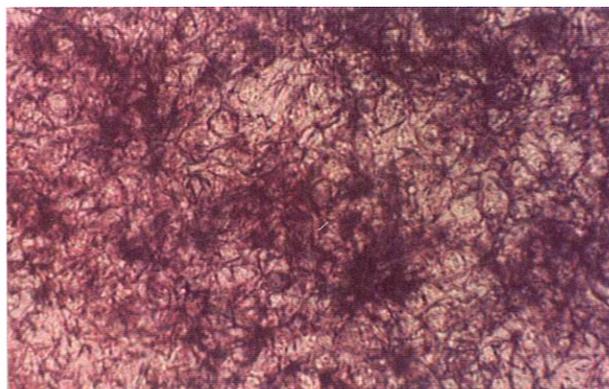


Fig. 3 MTT Test: precipitato di formazano blu in coltura cellulare di controllo, senza contatto con alcun materiale.

Dopo sterilizzazione in autoclave a 1 bar per 50 minuti i campioni sono stati immersi in un terreno di coltura a base di fibroblasti di connettivo di topo L-929 (Fig. 2) ottenuti da linee cellulari stabilizzate (Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia) per 24h e incubati a 37°C sotto cappa sterile presso il Dipartimento di Biologia Sperimentale Ambientale ed Applicata dell'Università di Genova. Le cellule Fibroblasti L-929 sono state coltivate per 72h su terreno di coltura idoneo (MEM: Terreno Minimum Essential Eagle's Medium + antibiotici + L-Glutamina + Siero + Growth Factors).

Come controllo negativo è stato utilizzato un disco di Oro e come controllo positivo un disco di piombo delle stesse dimensioni dei campioni. Il tipo di oro utilizzato è stato ILOR F2 PT, micro fine grain Alloys, (Nobil Metal) lega costituita da Au 54,0 Pt 2,0 Pd 3,4 Ag 26,5 Cu 13,5. Sono stati effettuati n° 3 esperimenti per campione per un totale di 24 esperimenti.

Una volta rimossi i campioni dalle colture cellulari senza rimuovere il mezzo (MEM) è stata introdotta in ogni pozzetto una quantità di 200 µl di soluzione MTT per la valutazione della vitalità cellulare dopo contatto con i campioni<sup>6</sup>. Il test con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2 yl)-2,5 difenil tetrazolio bromide) si basa sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi<sup>7-9</sup> (SDH) in cristalli di un prodotto bluastro denominato formazano (Fig. 3). I cristalli di formazano sono solubilizzati con dimetilsulfossido e la soluzione colorata è misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 560 nm.

Le cellule vitali, a differenza di quelle intossicate, riducono

no i sali di tetrazolio per cui la reazione che porta al precipitato di colore blu, sarà possibile solo a livello di cellule metabolicamente efficienti (Figg. 4, 5). Ottenute le diverse letture si è trovata la concentrazione di ogni singolo campione = concentrazione standard (2,5) x densità ottica campione/densità ottica standard (0,094). Si è calcolata la media e la deviazione standard riferita ad ogni campione e si è effettuata l'analisi statistica. Nel test di citotossicità MTT a 24 ore, sono state confrontate le medie dei valori ottenuti dalla lettura spettrofotometrica dei dati riguardanti i materiali testati, considerando come controllo sia il piombo che l'oro separatamente, mediante l'analisi della varianza (ANOVA) ad un criterio di classificazione. È noto che se il rapporto delle varianze è significativo, si hanno buoni motivi per pensare che reali differenze tra le medie esistano e siano sufficientemente grandi da emergere sopra la variabilità casuale.

Pertanto se l'analisi indica un rapporto tra le varianze significativo, si procede al confronto multiplo delle differenze fra il controllo (sia esso piombo oppure oro) e le altre variabili mediante il test post-hoc di Bonferroni.

## Risultati

I risultati della crescita cellulare con analisi qualitativa/morfologica al microscopio ottico sono illustrati nelle figure da 6 a 13 mentre i valori medi delle letture spettrofotometriche per tipo di materiale, espressi in mg/ml MTT, e i risultati dell'analisi statistica sono elencati nelle tabelle 1 e 2.

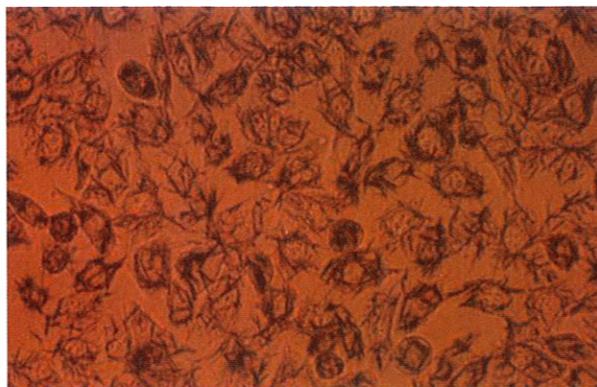


Fig. 4 MTT Test: precipitato di formazano blu in coltura cellulare a contatto con il Dei Clever Reply (Dei Italia). Si noti l'incorporazione di una gran quantità di precipitato da parte dei fibroblasti.

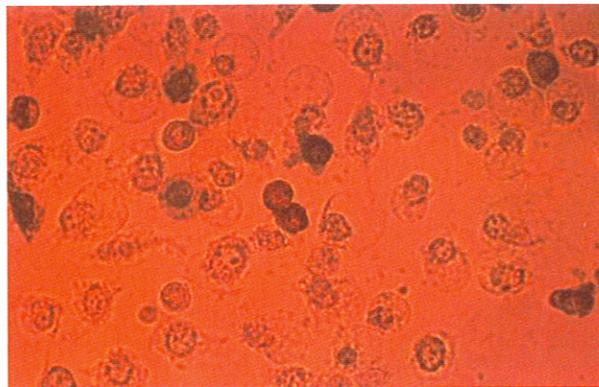


Fig. 5. MTT Test: scarsa incorporazione di formazano da parte di fibroblasti a contatto con il controllo positivo (Pb).

Tabella 1 Valori medi dei risultati del test MTT espressi in mg/ml MTT.

Test di citotossicità MTT 24 h

Variabile	Media (mg/ml MTT)	Dev Standard
Dei Clever	6,037	0,418
Estenia	5,990	0,530
Diamond	5,591	0,040
Gradia	5,524	0,405
Targis	5,365	0,133
Au	5,252	0,018
Sculpture	4,627	0,616
Pb	3,710	0,244

## Conclusioni

L'analisi tossicologica dei sei materiali compositi testati su fibroblasti L929 di topo, seguendo le norme I.S.O. 10993-1, ha confermato la loro non citotossicità per cui sono tranquillamente utilizzabili nella pratica odontoiatrica.

Il test MTT, con lo sfaldamento del sale di tetrazolio in formazano di colore blu, prodotto dall'enzima mitocondriale succinato-deidrogenasi, è stato molto utile per sag-

giare la sopravvivenza e la proliferazione cellulare.

La conversione si è avuta solo nelle cellule vive e l'ammontare del formazano prodotto era proporzionale al numero di cellule presenti.

Per cui è evidente come nei controlli, nell'oro e in alcuni dei compositi testati ci sia stato un alto numero di cellule che essendo vive, hanno incorporato stabilmente il formazano a differenza del piombo (controllo positivo) che alla lettura spettrofotometrica a 560 nm, ha dato valori più bassi di assorbimento; infatti aven-

Tabella 2 Differenza media dei risultati al test di citotossicità MTT 24 h. (Test post hoc di Bonferroni).

	Variabile							
	Au	Pb	Diam	Dei	Targis	Gradia	Sculpt	Estenia
Au	-	-	-0,339	-0,785	-0,113	-0,272	0,625	-0,738
Pb	-	-	-1,882*	-2,327*	-1,656*	-1,815*	-0,917	-2,281*
Diamond			-	-0,445	0,226	-0,067	0,964	0,399
Dei Clever				-0,671	0,512	1,410*	-0,046	
Targis					-	-0,159	0,738	0,625
Gradia						-	0,897	0,466
Sculpture							-	1,363*
Estenia								-

\*Differenza media statisticamente significativa con  $p < 0,05$ .

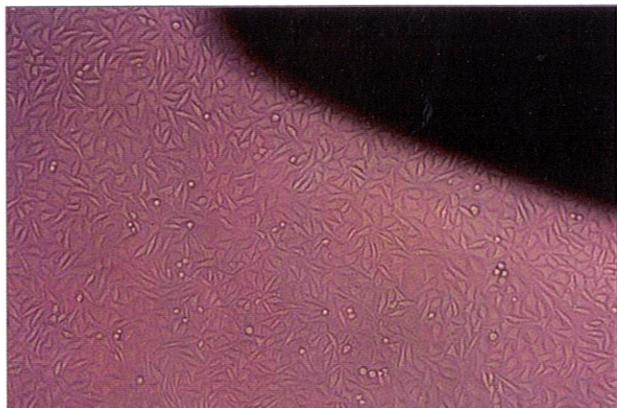


Fig. 6 Fibroblasti a contatto con oro: si noti la perfetta morfologia del corpo cellulare e la proliferazione a contatto con il materiale.

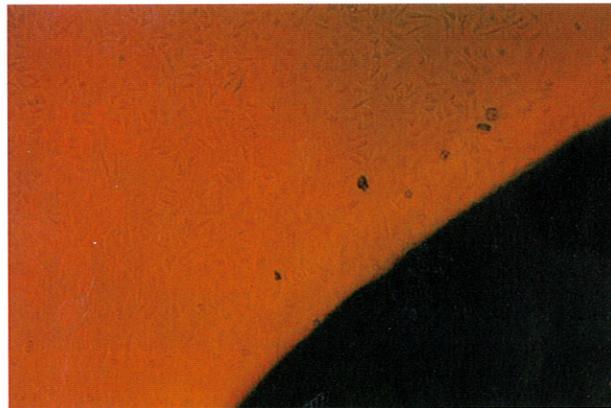


Fig. 7 Fibroblasti a contatto con Dei Clever Reply.

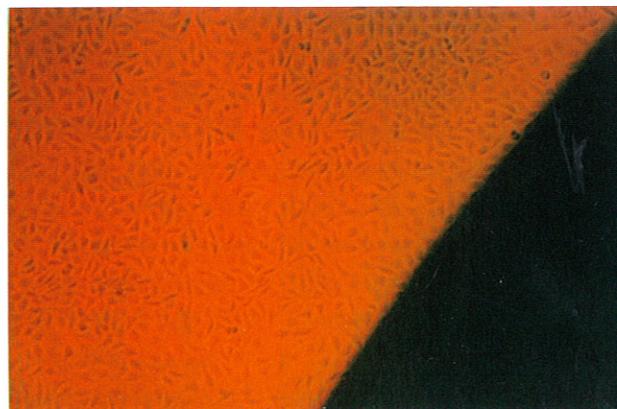


Fig. 8 Fibroblasti a contatto con Estenia.



Fig. 9 Fibroblasti a contatto con Diamond Crown.



Fig. 10 Fibroblasti a contatto con Gradia: cominciano a ridursi a contatto con il materiale e si può notare qualche fibroblasto con morfologia rotondeggiante sintomo di sofferenza cellulare.



Fig. 11 Fibroblasti a contatto con Targis.



Fig. 12 Fibroblasti a contatto con Sculpture: aumentata sofferenza cellulare dei fibroblasti a contatto con il materiale.

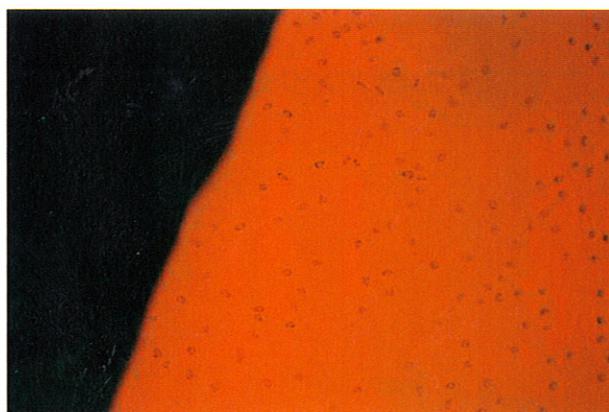


Fig. 13 Fibroblasti a contatto con piombo: alta tossicità, morte cellulare diffusa, sofferenza delle cellule superstiti.

do un numero inferiore di cellule vive, ha incorporato minor formazano. Dall'analisi statistica si può notare che i valori di citotossicità riferiti ai controlli positivo e negativo, sono risultati bassi in tutti i compositi testati con  $p < 0,05$ , a differenza dello Sculpture che, pur mostrando una scarsa citotossicità, non era significativo (come ci si sarebbe aspettato) nei confronti del controllo positivo (Pb).

I compositi testati sono risultati quindi tutti non citotossici; in assoluto, in questo studio in vitro, Dei CleverReply ha dimostrato la minore citotossicità seguito da Estenia, Diamond Crown, Gradia, Targis e Sculpture.

Quest'ultimo, pur non presentando significatività con Au (indice di biocompatibilità), aveva anche una non significatività con Pb (indice di tossicità).

Analizzando però i valori assoluti dell'attività enzimatica di SDH, si può comprendere come tale supposta corrispondenza alla tossicità del piombo possa essere imputabile ad un elevato valore di deviazione standard.

Lo Sculpture presentava infatti un valore medio assoluto di 4,627 mg/ml rispetto al Pb che è di 3,710 mg/ml (differenza -0,917), molto più vicino a quello di Au che è 5,252 (differenza 0,625). La biocompatibilità dei compositi di ultima generazione va ricerca-

ta nelle sempre più avanzate tecnologie di realizzazione di materiali<sup>10-14</sup>.

Sofisticati macchinari per la purificazione dei riempitivi, delle matrici, la sempre maggior attenzione ad evitare inclusioni di metalli alcalini (Li, Na, K) e di transizione (Fe, Al, Pb) che andando incontro a fenomeni di ossidazione, possono modificare la chimica del materiale; la scelta di coloranti di derivazione organica, approvati dalla FDA, l'assenza di componenti volatili, solubili e chimicamente instabili, rende i materiali compositi sempre più indicati all'utilizzo clinico quotidiano<sup>15</sup>. Si può concludere inoltre che le procedure tecniche di laboratorio per ottenere una buona levigatura, lucidatura e brillantatura della superficie<sup>16</sup>, se attuate con procedura controllata e standardizzata, non determinano citotossicità del materiale.

### Ringraziamenti

Si ringrazia il prof. G. Ravera del Dipartimento di Scienza della Salute, sezione di Biostatistica dell'Università di Genova per l'analisi statistica e il Laboratorio Odontotecnico Paolo Pagliari per la rifinitura dei campioni con procedura standardizzata.

### Autori:

Prof. Paolo Pera, professore ordinario, cattedra di Protesi Dentaria, CLSOPD, Università degli Studi di Genova, Presidente prof. Giorgio Blasi.

Dr. Enrico Conserva, professore a contratto di Protesi Dentaria II, CLSOPD Università degli Studi di Genova

Dr. Anna Acquaviva, professore a contratto, CLID Università degli Studi di Genova.

Dr. Eleonora Giuria, Odontoiatra.

Dr. Gianluigi Mariottini, ricercatore, Dipartimento di Biologia Sperimentale Ambientale (DIBISAA) Università degli Studi di Genova.

Prof. Luigi Pane, Dipartimento di Biologia Sperimentale Ambientale (DIBISAA) Università degli Studi di Genova.

Prof. Silvano Valente, professore associato, Università degli Studi di Genova.

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr. Enrico Conserva, professore a contratto di Protesi Dentaria II, CLSOPD Università degli Studi di Genova

Dr. Anna Acquaviva, professore a contratto, CLID Università degli Studi di Genova.

### Bibliografia

1. Williams D F. Definitions in biomaterials Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England. 1986; 3-5. Progress in Biomedical Engineering, 4, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. 1987;1-72.
2. Genova TF, Bodnar S, Vaccarella M, Stafford C, Schady K.M. Cytotoxicity testing: prediction of in vivo toxicity from in vitro tests. In: "Cell culture test methods" (ed.S.A. Brown), ASTM Special Technical Publication 810, ASTM 1916 Race Street, Philadelphia, Pa. 19103. 1983;71-76.
3. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. Clin Mater 1994; 16(1):21-60.
4. Mossman T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. Journal of Immunological Methods. 1983;1:55-57.
5. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z: In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996;12:186-193.
6. Denizot F., Lang R. Rapid calorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability J Immun Meth 1986;89:271-277.
7. Cole S.P.C. Rapid chemo sensitivity testing of human long tumour cell using the MTT assay. Cancer Chemother Pharmac 1986;17:259-263.
8. Fallon JF, Brucker RF, Harris CM. A re-examination of succinic dehydrogenase activity and its association with cell death in the interdigit of the chick foot J cell sci 1974;15: 17-29.
9. Maehara Y, Anai H, Tamada R, Sugimachi K. The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition Test for Predicting cell viability. J Cancer Clin Oncol 1987;23:273-276.
10. Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC & Krejci I. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. J. Oral Rehabil 2002;29:1.
11. Willershausen B, Schafer D, Pistorius A, Schulze R, Mann W. Influence of resin-based restoration materials on cytotoxicity in gingival fibroblast. Eur J Med Res 1999; 27,4(4):149-55.
12. Shajii L, Santerre JP. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. Biomaterials 1999;20(20):1897-908.
13. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. J Prosthet Dent 1994; 71(2):178-85.
14. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgama dental filling materials. Eur J Oral Sci 1998;106(2 Pt 2):696-706.
15. Ronchi F, Conserva E. Evoluzione tecnologica dei compositi, caratteristiche meccaniche e biologiche di una nuova matrice polimerica. Riv. Aesthetica Dossier 2000;1:8-14.
16. Yap AU; Mok BY. Surface finish of a new hybrid aesthetic restorative material. Oper-Dent. 2002;27(2):161-6.

## **Cytotoxicity analysis of composite materials for "metal-free" FPD: an in vitro investigation**

Paolo Pera, Enrico Conserva, Anna Acquaviva, Eleonora Giuria, Gianluigi Mariottini, Luigi Pane, Silvano Valente

The more and more frequent aesthetical requests from the patients have brought the actual dentistry to use, especially in prosthodontics, materials highly technological and reliable, from a physical-mechanic point of view, produced by the industry to such purpose and above all to an always smaller use of metallic substructures. But are such materials, both them composites or ceramics, also biocompatibles and biointegrables with the dental and periodontal structures? Purpose of this study has been to investigate in vitro the degree of cytotoxicity of six composite materials used in metal-free FPD and precisely: Gradia, Estenia, Targis, Diamond Crown, Dei Clever Reply and Sculpture. The materials have been tested following the ISO 10993 guidelines, performing the in vitro cytotoxicity test with the use of cells of mouse, fibroblasts L929 (isolated by muscular tissue) and cultivated in a fit ground of growth. The originality of this investigation is in the fact that the six composite materials, taken in examination, have been tested under the same conditions; the cytotoxicity test has been performed on these materials in contemporary way, in the same period, under the same conditions of temperature and humidity, by the same operator. All tested materials have been prepared and used according to the "clinical use" protocol: they are prepared directly from manufacturers and then finished up and polished with standard sequence from an only dental laboratory. All the tested composite materials have shown no cytotoxicity.

**Key Words:** Composite materials; Cytotoxicity; Metal-free.