

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Specialistica in Odontoiatria e Protesi Dentaria

Presidente: Prof. Paolo Menghini



**Materiali per l'incappucciamento della polpa: analisi
della citotossicità su odontoblasti murini**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Claudio Poggio

Correlatore

Chiar.ma Prof. Livia Visai

Tesi Sperimentale di Laurea di

Mirti Domenico

Matr. N. 366118/42

Anno Accademico 2012/2013

«*Aequam memento rebus in arduis
servare mentem*» (Orazio, Odi II, 3)

«*Conserva nelle asprezze mente uguale*»

«*Per aspera sic itur ad astra*»

(Seneca, Hercules Furens)

«*Attraverso le asperità si giunge alle stelle*»

Un sincero e profondo ringraziamento è rivolto al mio relatore, prof. Claudio Poggio, che mi ha assiduamente seguito e consigliato durante tutta la stesura della tesi con pazienza e sensibilità mettendomi a disposizione le sue preziose conoscenze.

Ringrazio inoltre la mia correlatrice, la prof.ssa Livia Visai, del dipartimento di Biochimica “A. Castellani” dell’università di Pavia, per il prezioso aiuto prestato durante le fasi di sperimentazione e per avermi messo a disposizione la propria professionalità e le strutture del suo dipartimento.

INDICE

1. INTRODUZIONE	6
2. L'INCAPPUCCIAMENTO DIRETTO E INDIRECTO DELLA POLPA	10
2.1. L'incappucciamento diretto	11
2.1.1. Indicazioni	11
2.1.2. Tecniche di esecuzione	12
2.2. L'incappucciamento indiretto	16
3. MATERIALI PER L'INCAPPUCCIAMENTO DELLA POLPA	18
3.1. Idrossido di calcio	19
3.2 MTA	23
3.3. Materiali valutati nella tesi	26
3.4. Dycal Ivory	28
3.5. Calcicur	31

3.6. Calcimol LC	33
3.7. TheraCal LC	35
3.8. ProRoot MTA	37
3.9. Biodentine	40
3.10. MTA-Angelus	42
4. SCOPO DELLA RICERCA	45
5. MATERIALI E METODI	47
5.1. Materiali Testati	48
5.2. Linea cellulare e condizioni di coltura	50
5.3. Conteggio delle cellule	51
5.4. Test di citotossicità	54
5.5. Acquisizioni immagini al microscopio a scansione laser confocale (CLSM)	59
5.6. Analisi Statistica	61
6. RISULTATI	62
6.1. Test di citotossicità	63
6.2. Acquisizioni immagini al microscopio a scansione	70

laser confocale (CLSM)	
6.3. Analisi statistica	76
7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	79
8. BIBLIOGRAFIA	87

1

INTRODUZIONE

1. INTRODUZIONE

L'odontoiatria conservativa ha lo scopo principale di reintegrare la perdita di sostanza dentale e mantenere la salute dentale al fine di proteggere e ristabilire la normale funzione pulpare. La polpa dentale gioca un importante ruolo nella formazione e nella nutrizione della dentina oltre che nell'innervazione e nella difesa del dente. La funzione primaria della polpa è la formazione della dentina, che comincia nel momento in cui le cellule mesenchimali periferiche si differenziano in odontoblasti e cominciano la deposizione di matrice collagene, in una sequenza di deposizione e mineralizzazione che termina con la completa formazione del dente. Anche dopo l'iniziale formazione, la polpa continua la produzione fisiologica di dentina dovuta all'invecchiamento del dente. La dentina di riparazione può anche essere prodotta in risposta a stimoli dannosi di tipo fisico o chimico. Gli odontoblasti mantengono i loro processi all'interno dei nuovi tessuti formati in modo da creare così dei veri canali di collegamento che servono per la nutrizione della dentina; questo processo è continuo fin quanto la polpa è biologicamente attiva. Il trasporto di fluidi e nutrienti infatti mantiene la vitalità pulpare e la resilienza necessaria a neutralizzare le tensioni e gli stress masticatori della dentina. Infine la polpa è responsabile della risposta ai vari stimoli, tramite un'azione di difesa che si esplica tramite la dilatazione dei vasi sanguigni, l'aumento di permeabilità e la presenza di cellule infiammatorie. Quando lo stimolo supera la capacità di guarigione della polpa possono rendersi necessari modificazioni del complesso pulpo-dentale, come restauri e riparazioni [1]. Ogni intervento restaurativo può risultare pericoloso per

la vitalità dell'elemento pulpare: quando la dentina subisce una lesione, ne risente anche la polpa dentale, che però reagisce in vario modo a seconda dell'entità della lesione stessa e della propria capacità reattiva. L'esecuzione di un restauro comporta, necessariamente una serie di operazioni (preparazione della cavità, otturazione della medesima, rifinitura e lucidatura del restauro) che, interessando la dentina, possono provocare uno stato di sofferenza pulpare più o meno lieve e reversibile. La protezione della salute pulpare consiste nell'applicazione di uno o più strati di specifici materiali da sottofondo tra il materiale da restauro e i tessuti dentali così da evitare stress addizionali al tessuto pulpare causati dalle procedure operative, dalla tossicità dei materiali da restauro e dalla penetrazione dei batteri attraverso possibili microinfiltrazioni. Nel caso di polpa dentale scoperta uno dei più comuni metodi di trattamento è l'incappucciamento diretto; che consiste nel posizionamento di un materiale biocompatibile e bioinduttore sulla polpa dentale esposta, al fine di preservarne la salute e stimolarne la riparazione tramite la formazione di tessuto mineralizzato [2], che ricopra e rinchioda la polpa, e sia in grado di indurre la formazione di nuove cellule pulpari [3]. La presenza di una barriera di tessuto duro deve essere riconosciuta sia come una barriera strutturale contro futuri stimoli dannosi, sia come un segno di ripresa biologica rappresentata dall'attività degli odontoblasti [4]. L'incappucciamento della polpa fa sì che vi sia un notevole grado di guarigione, caratterizzato dalla risoluzione dell'infiammazione e dalla riorganizzazione dei tessuti molli [5].

La biocompatibilità del materiale è di primaria importanza; infatti dal momento che questo rimarrà in contatto per molto tempo con i tessuti, dovrà avere le appropriate caratteristiche per evitare o limitare l'irritazione o la degenerazione del tessuto pulpare.

Il successo di questa terapia dipende dal tipo di lesione e dalla sua localizzazione, dallo stato di sviluppo del dente, dal materiale da incappucciamento usato e dall'integrità della cavità da restaurare [6].

2

L'INCAPPUCCIAMENTO DIRETTO E INDIRETTO DELLA POLPA

2. L'INCAPPUCCIAMENTO DIRETTO E INDIRETTO DELLA POLPA

2.1. INCAPPUCCIAMENTO DIRETTO

L'incappucciamento diretto ha lo scopo di ricoprire e proteggere la polpa dentale esposta con una sostanza atta a promuovere la cicatrizzazione della ferita pulpare e a favorire il ripristino della funzione dentinogenica, mantenendo la vitalità dell'elemento [7]. La polpa dentale, quando si trova esposta ad uno stimolo patogeno, limitato nel tempo e di lieve entità, è in grado di rispondere positivamente con processi difensivi di riparazione che portano alla formazione di dentina terziaria (anche detta di reazione), dotata di maggiore capacità protettive [8].

2.1.1. Indicazioni

- Esposizione accidentale nel corso di una preparazione cavitaria (in genere si verifica in corrispondenza di un cornetto pulpare).
- Frattura coronale penetrante (classe III di Hellis) conseguente ad un trauma di un dente anteriore.
- Pulpite cronica iperplastica esterna (anche detta polipo della polpa).

Le condizioni indispensabili affinché l'incappucciamento diretto abbia successo sono:

- giovane età del paziente (meglio se l'apice del dente non è ancora completamente formato),
- ridotte dimensioni, sia in estensione che in profondità, dell'esposizione pulpare;
- assenza di dentina cariata,
- polpa totalmente asintomatica fino al momento della esposizione accidentale (polpa clinicamente sana),
- assenza o modestissima emorragia (una forte emorragia pulpare depone per una grave ed irreversibile lesione a carattere infiammatorio).

2.1.2. Tecnica di esecuzione dell'incappucciamento diretto

Esposizione accidentale

L'esposizione accidentale è un incidente operatorio che si verifica soprattutto quando si esegue, sotto anestesia, una preparazione cavitaria in denti di giovani pazienti. In questi casi, per prevenire l'esposizione accidentale, è più indicato rimuovere la dentina rammollita dalle zone più profonde della cavità con un escavatore tagliente che può essere meglio controllato rispetto ad uno strumento rotante [9]. La lesione deve essere anzitutto detersa con un batuffolo di cotone sterile bagnato con soluzione fisiologica o con acqua di Calxyl evitando di generare pressione sulla polpa scoperta.

Successivamente, dopo avere asciugato con aria tiepida, si ricopre la polpa esposta con una pasta acquosa, non indurente, a base di idrossido di calcio (es. Calxyl), ed infine si applica, sul fondo della cavità, un preparato a base di idrossido di calcio (es. Dycal).

E' sconsigliabile applicare il preparato a base di idrossido di calcio direttamente sulla polpa esposta in quanto la sierosità del moncone pulpare crea dei problemi di posizionamento e di adesività [10]. L'idrossido di calcio, grazie al suo pH fortemente alcalino, possiede una azione dentinogenica mineralizzante, che ne fa il materiale di elezione per il mantenimento della vitalità pulpare. Quando l'idrossido di calcio viene posto a contatto con il tessuto pulpare, determina una zona superficiale (la debole solubilità di questo materiale si oppone alla sua diffusione nel tessuto pulpare) di necrosi (membrana di Nyborg), che viene rapidamente circondata da un'area di reazione infiammatoria.

Nei giorni successivi si verifica una graduale differenziazione di cellule e collagene, ed inizia il processo di mineralizzazione (ad opera degli odontoblasti) con formazione di una barriera di tessuto duro calcificato.

La cavità viene infine otturata con un cemento all'ossido di zinco ed eugenolo rinforzato, evitando di creare precontatti occlusali. Si potranno osservare dei transitori fenomeni iperemici, con modica sintomatologia dolorosa e con aumentata sensibilità al caldo e al freddo [11].

Se l'esito dell'intervento è favorevole la sintomatologia si attenuerà gradualmente con l'andare del tempo. Dopo alcuni mesi si controlla la vitalità del dente attraverso prove termiche ed elettriche, e si verifica la ricostruzione del tetto di dentina con esami radiografici (comparsa di una struttura calcificata radiopaca in corrispondenza della zona di esposizione pulpare); la chiusura della breccia da parte della dentina di reazione

avviene generalmente in 4-6 mesi [12].

Se tutto procede favorevolmente si può quindi eseguire il restauro definitivo senza asportare completamente il cemento all'ossido di zinco ed eugenolo rinforzato: un certo strato (1÷2 mm) può essere lasciato come sottofondo al materiale da otturazione definitiva.

Frattura coronale

Nel caso di una frattura coronale di un dente anteriore con esposizione pulpare l'incappucciamento diretto spesso tende a trasformarsi (in base al livello della lesione e quindi al maggiore o minore interessamento della polpa) in un vero e proprio intervento di pulpotomia (amputazione vitale della polpa). La polpa giovane, grazie all'ampiezza del canale e all'imaturità delle strutture apicali e periapicali, possiede una notevole reattività che le consente, anche se amputata, una buona guarigione con neoformazione di dentina e con chiusura apicale [13]. La tecnica dell'amputazione vitale è simile a quella dell'incappucciamento diretto: unica differenza è l'amputazione (parziale o totale) della polpa camerale, che deve avere un'estensione tale da consentire il posizionamento dei materiali protettivi [14]. Dopo aver eseguito l'anestesia si applica la diga di gomma (occorre usare cautela nell'applicare la diga poiché il dente ha subito un trauma recente) e si disinfetta il campo operatorio con acqua ossigenata; quindi, con una piccola fresa diamantata cilindrica o a palla, montata su turbina, si asporta la polpa camerale parzialmente o totalmente (l'arresto del taglio determina il tipo di pulpotomia che sarà quindi parziale o totale). Per poter controllare la conseguente emorragia, è essenziale che la polpa sia amputata in modo netto senza lacerazioni o sfrangiature [15].

A questo punto si può procedere alla ricopertura del moncone pulpare esposto con (nell'ordine): polvere di idrossido di calcio, cemento all'ossido di zinco ed eugenolo rinforzato, cemento al fosfato di zinco (il cemento al fosfato di zinco ha lo scopo di evitare il contatto tra l'eugenolo e la resina composita: l'eugenolo interferisce negativamente con il processo di polimerizzazione dei compositi). Si esegue infine la ricostruzione in resina composita avendo cura di creare sullo smalto un ampio smusso che consentirà di ottenere un buon sigillo periferico. Nei mesi successivi si effettueranno periodicamente i test termici ed elettrici ed i controlli radiografici.

Pulpite cronica iperplastica

Taluni Autori [16] consigliano di trattare questa situazione patologica (quando l'esposizione pulpare ha dimensioni ridotte) con un incappucciamento diretto, previa asportazione netta del polipo della polpa con un escavatore tagliente. La difficoltà principale consiste nell'ottenere una completa emostasi del moncone pulpare.

2.2. INCAPPUCCIAMENTO INDIRECTO

L'incappucciamento indiretto (incappucciamento naturale di Bonsack) è consigliabile quando ci si trova di fronte a processi cariosi ampi e profondi (non penetranti) a carico di denti di giovani pazienti che presentano modica o assente sintomatologia (ipersensibilità a stimoli caldi o freddi che scompare al cessare dello stimolo) [17]. In questi casi l'asportazione totale della dentina rammollita provocherebbe un'inevitabile scoperta pulpare. E' pertanto indicato astenersi dal rimuovere gli ultimi strati di dentina parzialmente decalcificata, posta nelle immediate vicinanze alla polpa. Le pareti della cavità devono essere invece completamente ripulite da tutta la dentina cariata. E' consigliabile effettuare la rimozione del tessuto infiltrato e decalcificato utilizzando un escavatore che consente una maggiore sensibilità e quindi un minore pericolo di scoperta accidentale della polpa [18]. Lo stato residuo di dentina parzialmente rammollita non deve essere né troppo sottile, per poter fornire alla polpa un sufficiente riparo, né troppo spesso, per permettere all'idrossido di calcio di stimolare la capacità di reazione del tessuto pulpare. La maggioranza degli Autori concorda nel ritenere valido un tetto di dentina con uno spessore compreso tra 0,5 ed 1 mm (poiché risulta difficile valutare clinicamente tale spessore è sovente necessario eseguire un esame radiografico). Dopo aver deterso ed asciugato la cavità, con le dovute precauzioni, si riveste la dentina con una pasta acquosa non indurente a base di idrossido di calcio o con una vernice composta; quindi si applica, nelle zone più profonde, un preparato a base di idrossido di calcio e si ottura la cavità intera con un cemento all'ossido di zinco ed eugenolo rinforzato.

Nei mesi successivi si effettuano periodicamente i test termici, elettrici e radiografici; a distanza di sei mesi, se si osserva la deposizione di una nuova dentina di reazione, si può procedere all'asportazione dell'intera otturazione provvisoria e della dentina rammollita [19] (la dentina rammollita si presenta asciutta, quasi secca e può essere rimossa con facilità). L'ultima operazione viene eseguita con cautela, utilizzando un escavatore. Infine si procede all'esecuzione dell'otturazione definitiva isolando il fondo cavitario come nel caso di una cavità profonda.

3

MATERIALI DA INCAPPUCCIAMENTO PULPARE

3. MATERIALI DA INCAPPUCCIAMENTO PULPARE

3.1. IDROSSIDO DI CALCIO

L'idrossido di calcio è stato per molto tempo il materiale d'elezione per l'incappucciamento pulpare e la pulpotomia. Le soluzioni a base di idrossido di calcio sono state largamente usate grazie alla loro capacità di stimolare la formazione di dentina di reazione, all'azione antibatterica, e alla possibilità di proteggere la polpa dagli stimoli termici [20] [21]. La prima formulazione di idrossido di calcio fu introdotta in odontoiatria da Hermann (1920) che ne presentò la capacità di indurre le cellule pulpari a formare una barriera mineralizzata, bloccando in questo modo tutta quanta la superficie esposta. L'idrossido di calcio ha attività antibatterica [22] e sembra funzionare efficacemente, ma l'esatto meccanismo di azione non è ancora conosciuto [23]; si sa per certo che gli ioni calcio liberati nella zona dell'esposizione pulpare dalla sospensione di idrossido di calcio non vengono utilizzati nella costruzione del ponte dentinale. Con l'aiuto di isotopi radioattivi è stato dimostrato che gli ioni calcio presenti nel ponte dentinale non derivano dall'idrossido di calcio applicato, ma dalla circolazione sistemica e dai vasi pulpari [24] [25]. Il ruolo dell'idrossido di calcio, tuttavia, potrebbe essere quello di indurre una necrosi coagulativa superficiale a livello del tessuto pulpare con il quale è in contatto [26].

Al di sotto di questa zona di necrosi coagulativa satura di ioni calcio, le cellule mesenchimali indifferenziate si differenziano in odontoblasti [27] o in osteoblasti [28] e cominciano a produrre la matrice [29] sulla quale andranno a posizionarsi gli ioni calcio provenienti dalla circolazione sistemica, fino a formare una nuova struttura costituita da dentina o da osteodentina. L'alta alcalinità del pH, oltre ad inibire in maniera variabile la crescita batterica [30], sta alla base del meccanismo di creazione dello stato necrotico; infatti a causa dell'alta alcalinità, le cellule che vengono a contatto con l'idrossido di calcio vanno incontro a necrosi, formando così una zona di cauterizzazione ed uno strato necrotico di spessore variabile [31]. Come dimostrato da vari studi in letteratura, l'effetto di cauterizzazione causato dall'idrossido di calcio è essenziale per la riparazione della polpa esposta [32]. Il pH alcalino inoltre è in grado di neutralizzare l'acido lattico secreto dagli osteoclasti e può evitare quindi la distruzione precoce del tessuto mineralizzato. L'idrossido di calcio può agire anche come tampone locale contro la reazione acida prodotta dal processo infiammatorio [33]. Heithersay ipotizzò inoltre che gli ioni calcio possano ridurre la permeabilità dei capillari, così che la minor presenza di fluido intercellulare crei una maggiore concentrazione di ioni calcio nell'area di mineralizzazione [34]. Per tutte queste ragioni i preparati a base di idrossido di calcio sono stati considerati per molto tempo il gold standard nel trattamento conservativo delle lesioni da esposizione della polpa [35].

Nonostante l'idrossido di calcio presenti tutti questi vantaggi, bisogna pur sempre ricordare che si tratta di un materiale solubile in acqua e negli acidi, e che presenta proprietà fisiche piuttosto deficitarie [36].

Numerosi studi effettuati nel follow up di pazienti soggetti a trattamento di incappucciamento pulpare hanno inoltre evidenziato che, nel ponte di tessuto duro calcificato formatosi dopo l'applicazione di idrossido di calcio, è stata riscontrata la presenza di numerosi tunnel e un'alta inclusione cellulare che possono portare a perdite e a penetrazione batterica nei tessuti pulpari, nonostante il sigillo permanente prodotto dagli agenti adesivi [37]. La formazione di questi tunnel non è provocata esclusivamente dall'idrossido di calcio, ma sono bensì la conseguenza dell'entità del trauma pulpare e del numero di vasi sanguigni lesionati durante l'esposizione meccanica.

È stato osservata la presenza di vasi sanguigni all'interno dei tunnel, che assicurano le risorse di calcio al tessuto necrotico. Gli ioni calcio nella zona necrotica inoltre sono responsabili della parziale calcificazione distrofica della necrosi coagulativa. I difetti a tunnel che così si vengono a creare causano un'interruzione morfologica della continuità della barriera del ponte dentinale; cosicché, non si riesce a costituire nè una barriera solida di dentina, nè un valido sigillo biologico per il lungo periodo contro l'infiltrazione e l'infezione batterica. Conseguentemente la presenza di questi tunnel permetterà la contaminazione orale, ad esempio con i batteri e con le loro tossine, che sono in grado di guadagnare l'accesso alla camera pulpare attraverso la fessura marginale dell'interfaccia dente otturazione [38].

A tal fine bisogna ricordare, che la presenza dei batteri e dei loro prodotti di scarto, e non il medicamento in sé, è il principale fattore responsabile dell'inflammazione e della necrosi pulpare [39]. Un altro tipo di difetto riscontrato all'interno del ponte dentinale è rappresentato dall'inclusione cellulare generalmente situata tra la zona di necrosi coagulativa e la zona calcificata.

3.2. MTA

Negli ultimi anni sono stati commercializzati nuovi materiali che vantano ottime caratteristiche come la biocompatibilità e la proprietà antibatterica, oltre che essere in grado di agire come ottimi sigillanti e bioinduttori, in modo da favorire più rapidamente la guarigione dei tessuti pulpari e aumentare la longevità del dente dopo l'incappucciamento diretto e la pulpotomia [40]. Nei primi anni '90 presso l'università di Loma Linda in California, è stato messo a punto da Torabinejad un nuovo cemento, l'MTA (mineral trioxide aggregate) [41]. L'MTA è stato prodotto su derivazione del cemento di Portland, impiegato in edilizia fin dal 1824 e dotato di spiccate capacità adesive tra i costituenti edili. La composizione dell'MTA prevede una miscela di silicato di calcio, ossido di bismuto, carbonato di calcio ed altri eccipienti. Si presenta sotto forma di polvere, bianca o grigia, di consistenza finissima, da miscelare con acqua distillata. Quando la polvere e l'acqua distillata vengono miscelate, l'MTA forma cristalli di ossido di calcio in una struttura amorfa, costituita dal 33% di calcio, 49% di fosfato, 6% di silicati e 5% di altri costituenti [42]. Il tempo di indurimento è di 2 ore e 45 minuti, quello di presa, invece, è approssimativamente di 21 giorni [43]; una caratteristica peculiare di questo cemento è la capacità di indurire anche in ambiente umido; ciò contribuisce a determinare un preciso adattamento, anche dove è difficile ottenere un campo perfettamente asciutto [44], come per esempio in un sito chirurgico.

Inoltre L'MTA presenta anche capacità antimicrobiche [45]; il meccanismo d'azione è dovuto al rilascio di ioni idrossido [46] che aumentano il pH del sito, creando un substrato sfavorevole alla colonizzazione batterica [47]. L'alto valore di pH dell'MTA (12,5) ha portato alcuni Autori ad ipotizzare che l'attività biologica e la biocompatibilità di questo materiale siano dovute alla formazione di idrossido di calcio all'interno del sito [48]. D'altra parte il rilascio contemporaneo di ioni calcio nel tessuto adiacente consentirebbe la neoformazione di dentina, cemento e addirittura osso, sulla superficie del materiale, a seconda del sito dove esso è impiegato [49]. L'efficacia e la biocompatibilità di questo materiale sono sostenute, oltre che dai risultati clinici, anche da studi in vitro che dimostrano come colture di osteoblasti siano in grado di sopravvivere e moltiplicarsi su piastre di MTA e anche di stabilire, attraverso recettori di superficie, un ancoraggio al materiale [50]. Osservazioni simili sono state compiute anche per quanto riguarda i fibroblasti del legamento parodontale [51]. Nei confronti delle cellule costituenti l'organo pulpo-dentinale è stato osservato, in vitro, [52] che la coltura di odontoblasti e di cellule pulpari indifferenziate, su MTA, non induce apoptosi cellulare e inoltre stimola la proliferazione e la differenziazione di queste linee cellulari. Alcuni Autori avanzano l'ipotesi che l'abilità da parte dell'MTA di formare il dentin bridge, negli incappucciamenti diretti della polpa esposta, possa essere in parte spiegata anche con le proprietà induttive nei confronti della proliferazione/differenziazione cellulare.

La migliore efficacia e la più elevata biocompatibilità dell'MTA rispetto alle preparazioni a base di idrossido di calcio, sono dimostrate da alcuni studi che attestano come l'MTA favorisca, non solo una maggiore stimolazione delle cellule pulpari [40], ma anche la formazione di una barriera dentinale più solida, nel sito dell'esposizione pulpare. Risulta quindi facilmente comprensibile come sia determinante la scelta del materiale da incappucciamento che idealmente dovrebbe possedere innanzitutto ottime caratteristiche fisico-chimico-meccaniche come la capacità di sigillo, la stabilità dimensionale e di utilizzo a contatto con i fluidi orali, l'adesività per tessuti calcificati, l'isolamento chimico elettrico e termico e la radiopacità; dovrebbe avere inoltre un tempo di lavorazione adeguato, facile manipolabilità, azione antibatterica ma non istiolesiva e favorire uno stimolo dentinogenico mineralizzante [53]. Inoltre è fondamentale che il materiale sia non solo atossico, ma bensì biocompatibile e bioinduttore, cosicché possa agire in modo da favorire la riorganizzazione delle strutture lese promuovendo, nel contempo, la riparazione tissutale [54].

3.3. Materiali Testati

Per questo studio sono stati scelti sette materiali da incappucciamento pulpare (vedi tabella 1): Dycal Ivory, Calcicur, Calcimol LC, TheraCal LC, ProRoot MTA, Biodentine e MTA-Angelus. Nella tabella 1 vengono presentati i suddetti materiali, la ditta produttrice, la composizione chimica e le caratteristiche chimico-fisiche.

MATERIALE	DITTA PRODUTTRICE	CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE
Dycal Ivory	Dentsply Maillefer, Konstanz, Germany	Forma: pasta base: colore giallo chiaro pasta catalizzatrice: pasta bianca Valore di pH: pasta base: non disponibile pasta catalizzatrice: 11,5 Solubilità in acqua: non Solubile Conservare a Temperatura ambiente o inferiori
Calcicur	VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany	Colore: Bianco Forma: Pastosa Odore: Inodore Valore pH a 20°: 12 solubilità in acqua: completamente miscibile Conservare ad una temperatura di 15 °C - 23 °C
Calcimol LC	VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany	Colore: Bianco Forma: Pastosa Odore: caratteristico Valore pH a 20°: 9 Solubilità in acqua: poco e/o non miscibile Conservare la confezione ben chiusa ad una temperatura tra 4°C - 23°C e proteggere da luce e umidità
TheraCal LC	Bisco Dental Products, Richmond, Canada	Colore: Grigio Forma: Pastosa Odore: Silicato acrilico valore pH a 20°: 10 solubilità in acqua: miscibile Conservare in posti asciutti ad una temperatura compresa tra 20-25°

ProRoot MTA	Dentsply Maillefer, Konstanz, Germany	Odore: non particolare Forma: Liquido + Polvere Colore: grigio Valore pH: 12-13 Solubilità in acqua: leggermente solubile Conservare in luoghi asciutti Tempo di lavoro di 5 minuti
Biodentine	Septodont, Saint-Maur, France	Forma: liquido e polvere Valore pH: non disponibile Solubilità in acqua: diluibile e solubile
MTA-Angelus	Angelus Dental Solution, Londrina, Brazil	Forma: liquido e polvere Colore: bianco Valore pH: 12 Solubilità in acqua: poco solubile Tempo di presa: tra 10 e 15 minuti

Tabella 1: Materiali da incappucciamento usati, ditta produttrice, composizione chimica e caratteristiche chimico-fisiche.

3.4. Dycal Ivory

È un cemento a base di idrossido di calcio, radiopaco, non solubile in acqua. Viene commercializzato come sistema autopolimerizzante pasta-pasta; in particolare un tubetto contiene la pasta base, mentre l'altro contiene la pasta catalizzatrice; entrambi sono correlati di beccuccio e ugello di plastica. La reazione di presa avviene miscelando uguali quantità di pasta base (di colore più scuro) e pasta catalizzatrice (di colore più chiaro) fino ad ottenere una pasta di colore uniforme.

Composizione chimica dichiarata dal produttore:

- Pasta base:

-butilenglicoleedisalicilato <50%

-tungstato di Calcio <20%

-ossido di Zinco <15%

- Pasta catalizzatrice:

- idrossido di Calcio <55%

- ossido di Zinco <15%

- diossido di Titanio <10%

Il tempo di indurimento (in condizioni standard a 21°C e umidità relativa del 50%) viene indicato dalla ditta produttrice in 2/3 minuti. Dalle indicazioni per l'uso che correlano la confezione commerciale, risulta che variazioni del rapporto base/catalizzatore possono variare la quantità di idrossido di calcio presente nella massa finale e che il tempo di indurimento risulta essere influenzato dai cambiamenti di umidità e di temperatura dell'ambiente.

Indicazioni:

- incappucciamento diretto della polpa dopo pulpotomia;
- incappucciamento indiretto della polpa nei casi di carie profonda;
- liner protettivo sotto materiali da restauro/otturazione, cementi e altri tipi di sottofondi.



Figura 1: Dycal Ivory è un materiale monocomponente radiopaco e fotopolimerizzabile a base di idrossido di calcio.

3.5. Calcicur

Calcicur è un materiale costituito da una pasta di idrossido di calcio su base acquosa. È radiopaco, ed autoindurente pronto all'uso. Il calcicur è completamente miscibile in acqua, è di colore bianco, ha una forma pastosa ed un odore caratteristico. Inoltre pare abbia un effetto antimicrobico grazie all'elevato valore di pH (oltre 12,5). Viene commercializzato in confezioni che contengono una siringa da 2,5 gr contenente il prodotto e delle cannule di applicazione.

Composizione chimica indicata dal produttore:

- diidrossido di calcio 25-50%
- altri eccipienti non pericolosi n.d

Indicazioni:

- incappucciamento diretto della polpa dopo pulpotomia;
- incappucciamento indiretto della polpa nei casi di carie profonda;
- rivestimento della cavità come protezione contro gli attacchi acidi dei cementi;
- otturazione provvisoria del canale radicolare;
- disinfezione del canale radicolare.



Figura 2: Calcicur è una pasta di idrossido di calcio su base acquosa, radiopaca, autoindurente pronta all'uso.

3.6. CALCIMOL LC

Calcimol LC è un materiale monocomponente, radiopaco e fotopolimerizzabile a base di idrossido di calcio. Il Calcimol è un preparato di colore bianco, forma pastosa e colore caratteristico.

Ha un valore di pH, a 20°C, pari a 9 ed è poco, o non miscibile in acqua. Viene commercializzato in confezioni contenenti due siringhe da 2ml con le rispettive cannule di applicazione.

Composizione chimica dichiarata dal produttore:

- uretanodimetacrilato 25-50%
- diidrossido di calcio 2,5-5%
- 2-dimetilaminoetil metacrilato < 2,5%
- altri eccipienti n.d

Indicazioni:

- incappucciamento pulpare indiretto;
- per rivestimenti sotto tutti i materiali d'otturazione;
- come protezione al usare la tecnica di mordenzatura.



Figura 3: Calcimol LC E' un materiale monocomponente radiopaco e fotopolimerizzabile a base di idrossido di calcio.

3.7. TheraCal LC

TheraCal LC è un protettore/foderante fotopolimerizzabile, in silicato di calcio con modificazione resinosa, ideato per proteggere il complesso pulpodentinale. TheraCal LC si presenta di colore grigio, di forma pastosa, e ha un odore simile al silicato acrilico. È completamente miscibile in acqua e si presenta con un valore di PH a 10°C pari a 10. Il TheraCal LC viene commercializzato in confezioni che possono contenere o una singola siringa di 1 g oppure 4 siringhe da 1 g ciascuna.

Composizione chimica indicata dal produttore:

- cemento Portland di tipo 3 <60%
- polietilene Glicole dimetacrilato <50%
- zirconato di Bario <10%

Indicazioni:

- incappucciamento diretto della polpa dopo pulpotomia;
- incappucciamento indiretto della polpa nei casi di carie profonda;
- liner protettivo sotto materiali da restauro/otturazione, cementi e altri tipi di sottofondi.



Figura 4: TheraCal LC è un protettore/foderante fotopolimerizzabile in silicato di calcio con modificazione resinosa.

3.8. ProRoot MTA

Il ProRoot MTA è un materiale per riparazioni di perforazioni del canale radicolare che viene utilizzato anche per gli incappucciamenti pulpari; è una polvere costituita da finissime particelle idrofile che si addensano in presenza di acqua. L'idratazione della polvere crea un gel colloidale che si solidifica formando una forte barriera impermeabile.

Ha la particolare caratteristica di indurire in ambiente umido, quindi quando viene utilizzato in presenza di sangue, non subisce l'infiltrazione da parte dei liquidi e dei batteri.

Composizione chimica indicata dal produttore:

• cemento Portland	75%
• silicato Tricalcico	n.d.
• ossido di Bismuto	20%
• silicato Dicalcico	n.d.
• alluminato tricalcico	n.d.
• ferrito Alluminato Tetracalcico	n.d.
• solfato diidrato di calcio	5%

Le analisi spettrometriche e microscopiche hanno chiarito che i componenti più rappresentati sono ioni calcio e fosforo e che la radiopacità necessaria è assicurata dall'ossido di bismuto.

Al momento della manipolazione presenta un pH di 10,5 che si innalza a 12 tre ore dopo. Macroscopicamente il materiale appare sabbioso e di colore grigio o bianco. Caratteristiche sfavorevoli sono un tempo di indurimento molto elevato (sopra le 2 ore) e una bassa resistenza alla compressione. Il ProRoot MTA viene commercializzato dalla Dentsply e presentato in confezioni monouso sigillate unitamente a piccole pipette preosate di soluzione fisiologica sterile. La casa produttrice consiglia di mescolare il prodotto interamente (una busta per una dose di liquido) fino ad ottenere un impasto uniforme. Il tempo di applicazione è di 5 minuti; il prodotto può essere mantenuto utilizzabile più a lungo coprendolo con una garza bagnata.

Il prodotto preparato può essere applicato con una siringa (tipo Messiger o Dovgan) o con una spatola e compattato con un otturatore da amalgama.

Indicazioni:

- per sigillare le perforazioni del canale radicolare;
- come tampone apicale per la riparazione di canali radicolari durante la fase di apacificazione;
- per l'incappucciamento della polpa;
- in chirurgia periapicale.



Figura 5: ProRoot MTA: È un materiale per otturazioni retrograde, riparazioni nel canale radicolare, ed incappucciamenti della polpa.

3.9. Biodentine

Il Biodentine è un nuovo cemento bioattivo con proprietà meccaniche simili a quella della dentina. Ha effetti positivi sulla polpa dentaria e sulla formazione di dentina terziaria. Viene commercializzato in confezioni che comprendono delle capsule, contenenti la polvere, unitamente a piccole pipette preosate di soluzione fisiologica sterile.

Composizione chimica dichiarata dal produttore:

- | | |
|--|--------|
| • carbonato di calcio | 10-25% |
| • silicato Tricalcico | n.d |
| • soluzione acquosa di cloruro di calcio ed eccipienti | n.d |
| • altri eccipienti | n.d |

Indicazioni:

- incappucciamento diretto e indiretto della polpa;
- perforazioni;
- riassorbimenti Interni ed esterni;
- apacificazione e otturazioni retrograde.



Figura 6: Biodentine è un nuovo cemento bioattivo con proprietà meccaniche simili a quelle della dentina.

3.10. MTA-Angelus

MTA-Angelus è un cemento endodontico composto da microparticelle idrofile di molti ossidi minerali. In presenza di acqua, genera un gel colloidale che si solidifica presto per formare una forte barriera impermeabile [55]. MTA-Angelus presenta molti vantaggi se comparato ai cementi di vecchia generazione; presenta un'eccellente chiusura e resistenza all'infiltrazione marginale così da prevenire la migrazione batterica e la penetrazione di fluidi nel canale radicolare e permette anche una naturale risposta alla guarigione senza infiammazioni nei casi di perforazioni radicolari stimolando la formazione di cemento peri-radicolare. Promuove la formazione di un ponte di dentina se utilizzato in casi di incappucciamento della polpa, e inoltre, diversamente dagli altri cementi, che necessitano di un campo di utilizzo completamente asciutto, MTA-Angelus mantiene le sue proprietà anche in ambienti umidi (ad es.: trattamenti chirurgici in seguito a perforazione apicale; otturazioni retrograde). Infatti in presenza di umidità MTA-Angelus non presenta un grado di solubilità significativo, garantendo un eccellente sigillo e un'ottima resistenza alle infiltrazioni marginali. MTA-Angelus in contatto con l'acqua forma un gel che solidifica in breve tempo; infatti il tempo di presa varia dai 10 fino a 15 minuti. Comunque sia non è necessario aspettare la presa definitiva per proseguire il trattamento.

La radiopacità è superiore a quella di dentina e osso; si avvicina molto a quella della guttaperca, mentre il pH essendo di valore 12 è molto alcalino.

Composizione chimica indicata dal produttore:

- silicio n.d.
- ossido di potassio; n.d.
- ossido di alluminio; n.d.
- ossido di sodio; n.d.
- ossido ferrico; n.d.
- anidride solforica; n.d.
- ossido di Calcio; n.d.
- triossido di Boro; n.d.
- ossido di Magnesio; n.d.
- Residui insolubili di silice cristallina, solfato di potassio e solfato di sodio.

Indicazioni:

- incappucciamento diretto e indiretto della polpa;
- perforazioni;
- riassorbimenti interni ed esterni;
- apacificazione e otturazioni retrograde.



Figura 7: MTA-Angelus è un cemento endodontico composto da microparticelle idrofile di molti ossidi minerali. In presenza di acqua, genera un gel colloidale che si solidifica presto per formare una forte barriera impermeabile.

4

SCOPO DELLA RICERCA

4. SCOPO DELLA RICERCA

Come riportato da diverse ricerche [56], ogni materiale applicato in prossimità della polpa dentale causa una risposta specifica del tessuto pulpare che varia in base alla composizione e alla citotossicità del materiale stesso.

È di fondamentale importanza quindi che ogni intervento clinico effettuato in prossimità, o a diretto contatto con la polpa dentale si avvalga di materiali di cui si abbia dimostrata biocompatibilità, o ancora meglio, che possano garantire un effetto bioinduttore e riparativo delle cellule pulpari e del ponte duro di tessuto dentinale [57]

L'obiettivo del presente studio, è stato quello, di valutare e confrontare la citotossicità e la biocompatibilità, in vitro, di sette materiali da incappucciamento pulpare.

L'esame in vitro è stato preferito alla prova clinica per poter confrontare i materiali in identiche condizioni ambientali e di laboratorio tali quindi da permettere di standardizzare i risultati.

5

MATERIALI

E

METODI

5. MATERIALI E METODI

5.1 MATERIALI TESTATI

Per questo studio sono stati scelti sette materiali da incappucciamento pulpare.

I materiali testati sono stati presentati nella tabella 1 (paragrafo 3.3.).

Dei sette prodotti sottoposti a valutazione, tre sono a base di idrossido di calcio (Dycal Ivory, Calcicur, Calcimol LC). Due, il ProRoot MTA e l'MTA-Angelus, presentano come costituenti principali l'MTA (mineral trioxide aggregate). Il TheraCal LC è costituito prevalentemente da cemento di portland, mentre il Biodentine è un materiale costituito da carbonato di calcio e silicato tricalcico.

Nella tabella 2 sono riportate le istruzioni d'uso di ogni materiale da incappucciamento pulpare, così come riportate dalla casa produttrice.

MATERIALE		ISTRUZIONI D'USO
1	Dycal Ivory	Stendere sul blocchetto d'impasto uguali quantità di pasta base e catalizzatore e miscelare per 10 sec circa. Applicare l'impasto ottenuto sulla superficie dentale e compattare con un'otturatore a palla evitando di toccare i margini della cavità
2	Calcicur	Dopo aver pulito ed essiccato la cavità, applicare la pasta Calcicur in strati sottili fino a raggiungere lo spessore desiderato. Ogni strato deve essere lasciato essiccare brevemente oppure deve venir essiccato con la siringa dell'aria
3	Calcimol LC	Applicare direttamente il prodotto dalla siringa fino a raggiungere lo spessore desiderato. Dopodiché fotopolimerizzare con luce blu per 20 secondi circa
4	TheraCal LC	Applicare direttamente il materiale sulla superficie desiderata in strati incrementali. Fotopolimerizzare per 20 secondi circa, fino ad ottenere l'indurimento
5	ProRoot MTA	Miscelare la polvere contenuta nella bustina con il liquido della fiala monodose per circa un minuto, in modo che tutte le particelle della polvere siano idratate. Distribuire il ProRoot sulla superficie desiderata, compattare con otturatore e lasciare indurire il cemento
6	Biodentine	Posizionare la capsula di Biodentine sul supporto; aprirla e versare il contenuto della fiala monodose al suo interno e quindi richiudere la capsula. Porre la capsula in un miscelatore per circa 30 sec con una velocità di 4000 oscillazioni al minuto. Riaprire la capsula, recuperare il materiale e portarlo in sede con uno strumento apposito
7	MTA-Angelus.	Distribuire la polvere e il liquido su una piastra di vetro; dopodiché miscelare per 30 sec circa fino ad ottenere un composto omogeneo. Con un carrier sterile posizionare il prodotto nell'area desiderata e compattarlo bene.

Tabella 2: istruzioni d'uso dei materiali testati. (dati forniti dal produttore).

5.2. LINEA CELLULARE E CONDIZIONI DI COLTURA

È stata utilizzata una linea cellulare costituita da odontoblasti murini (MDCP-23). Secondo MacDougall [58] per lo studio degli effetti citotossici dei materiali dentari le linee cellulari di odontoblasti sono preferibili all'utilizzo di altre linee cellulari. Questo perché gli odontoblasti formano il contorno periferico della polpa e sono le prime cellule ad essere affette dalla tossicità dei materiali dentari. Le cellule MDCP-23 sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato con: 10% di FBS (siero fetale bovino), 2% di glutammina, 2% di sodio piruvato, 0,4% di anfotericina B e 1% di streptomina/penicillina. Le colture sono state incubate in termostato alla temperatura di 37°C, in atmosfera umidificata, con il 5% di CO₂ [59].



Figura 8: cellule odontoblaste murine MDCP-23.

5.3. CONTEGGIO CELLULARE

Le cellule adese, per poter essere contate, sono state staccate dal fondo della fiasca utilizzando una soluzione di tripsina/EDTA, in modo da separarle le une dalle altre e ottenere una sospensione di cellule singole.

A questo punto è stato aggiunto del medium di coltura per inattivare l'azione della tripsina e quindi la miscela contenente terreno e tripsina è stata trasferita in una provetta e centrifugata a 1800 RPM (velocità centrifuga) per 4 minuti in modo tale da separare le cellule dal medium.

Al termine della centrifugazione è stato poi rimosso il surnatante e il pellet contenente le cellule è stato risospeso in 5 ml di terreno di coltura fresco. È stata poi effettuata una diluizione in rapporto 1:10 della sospensione cellulare appena tripsinizzata con il colorante vitale tripan blu, ossia un colorante in grado di colorare specificamente le cellule morte. Più precisamente, le cellule vive non si colorano poiché la struttura della membrana è intatta, mentre le cellule morte risulteranno completamente colorate di blu, in seguito alla penetrazione del colorante al loro interno; cosicché, all'osservazione con microscopio ottico, queste appaiono luminose e immediatamente riconoscibili.

Una volta effettuata la diluizione, si è proceduto ad inserire la sospensione cellulare nella camera di Burker per procedere con il conteggio.

La camera di Burker è un apposito strumento che viene utilizzato per il conteggio di cellule di origine animale o umana; essa è costituita da un vetrino rettangolare, con lati rispettivamente di 7,5 cm e 3,5 cm e uno spessore di 4 mm. Presenta 2 celle che hanno una profondità di 1/10 mm dove il piano di ogni cella risulta diviso in 9 quadrati di lato

1 mm. Ciascuno dei 9 quadrati comprende: 16 quadrati grandi di una superficie di $1/25$ mm². Ognuno di questi quadrati è suddiviso in nove quadrati più piccoli, con una superficie di $1/400$ mm², e 24 rettangoli con una superficie di $1/100$ mm².

Al microscopio ottico vengono contate le cellule presenti all'interno dei tre quadrati più grandi posizionati sulla diagonale, quindi viene fatta la media ed il valore ottenuto viene moltiplicato per il fattore di diluizione, e per 104, ossia il fattore di conta della camera di Burker.

Dopo aver eseguito la conta delle cellule presenti sui 3 quadrati diagonali della camera, aventi ciascuno un volume di $0,1$ mm³, è stato moltiplicato il valore medio delle cellule ottenuto per il fattore di diluizione, ovvero 10, e poi per 10.000 per avere il numero di cellule per ml.

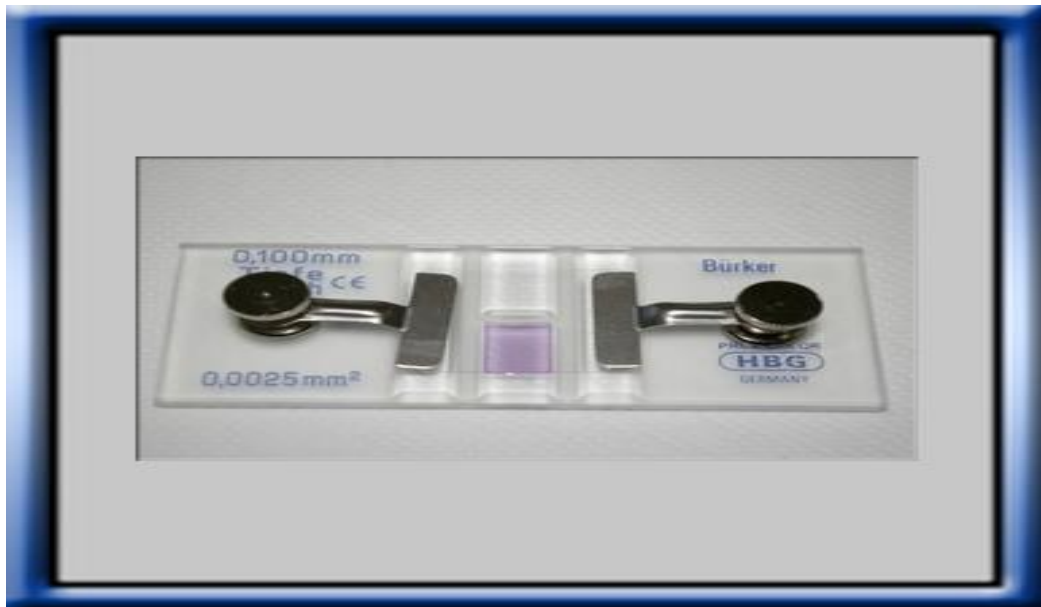


Figura 9: camera di Burker.

Contando le cellule presenti all'interno dei tre quadranti più grandi posizionati sulla diagonale si ottengono i seguenti valori: $(72+60+90)= 222$ (numero di cellule contate).

Si procede calcolando la media: media: $222/3= 74$.

A questo punto la media ottenuta viene moltiplicata per il fattore di diluizione (10) e per il fattore di conta (10^4); si avrà quindi: $74 \times 10 \times 10^4 = 7.400.000$.

7.400.000 è quindi il numero di cellule odontoblaste murine contenute in 1 ml di terreno di coltura.

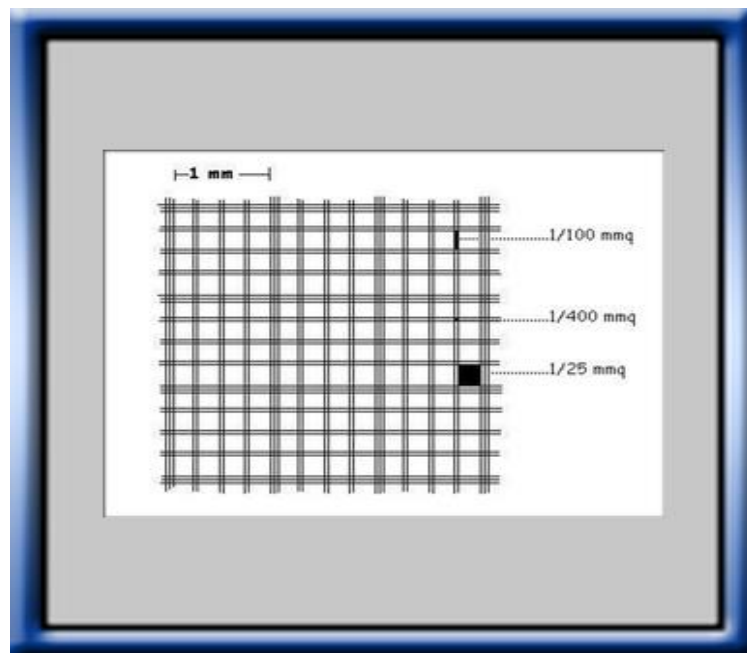


Figura 10: struttura e reticolato della Camera di Burker.

5.4. TEST DI CITOTOSSICITÀ

La citotossicità dei materiali da incappucciamento pulpore è stata valutata mettendo in contatto indiretto i materiali con gli odontoblasti murini della linea cellulare MDCP-23, usando il metodo a pozzetti Transwell (Sigma-Aldrich), un test in vitro senza contatto diretto tra cellule e materiali [60].

Il vantaggio di usare un contatto indiretto sta nel fatto che, dopo la formazione del bridge di tessuto duro, le cellule ed i materiali sono separati da questo strato più o meno spesso di dentina; perciò i test indiretti in vitro, riproducono al meglio questa situazione [61; 62; 63].

Il supporto permeabile a pozzetti Transwell ha una struttura a 24 pozzetti con inserti a membrana collegati tramite un vassoio rigido che consente di maneggiare tutti i 24 supporti Transwell in un'unica unità.

Il filtro superiore di ogni pozzetto ha 24 mm di diametro ed è formato da una membrana in policarbonato con le dimensioni dei fori di 0,3 μm [64].

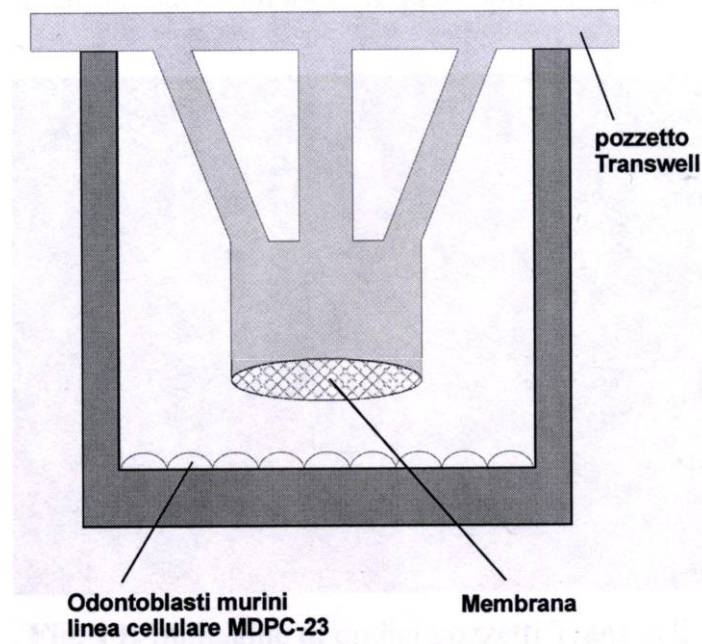


Figura 11: schema di un pozzetto Transwell.

Al fine di standardizzare i campioni da sottoporre alle diverse analisi e valutazioni si è provveduto a posizionare ogni materiale su dischi sterili di carta di 0.5 cm di diametro.

Tutti i materiali da testare sono stati preparati e miscelati sotto cappa sterile seguendo le modalità di preparazione consigliate dalla casa produttrice.

Il materiale in eccesso è stato rimosso utilizzando apposite spatole sterili.

Il Dycal Ivory, il ProRoot MTA, il Biodentine e l' MTA-Angelus sono stati miscelati su apposite piastre di vetro per poi in seguito essere posizionati sui dischetti di carta con carrier sterili.

Il Calcicur, il Calcimol LC ed il TheraCal LC sono stati posizionati direttamente sui dischi di carta utilizzando le apposite siringhe e i beccucci dati in dotazione dalle ditte produttrici.

I materiali fotopolimerizzabili, quali il Calcimol LC e il TheraCal LC, dopo l'applicazione, sono stati polimerizzati con una lampada a led (Elipar™, 3M ESPE, Minnesota, USA) per 20 secondi a 800 mW/cm^2 .

In seguito i dischi di carta con sopra il materiale polimerizzato sono stati posizionati sui filtri superiori dei pozzetti Transwell, a loro volta disposti a contatto con i 24 pozzetti di coltura della piastra, contenenti ognuno circa 200.000 cellule, equivalenti a circa $27 \mu\text{l}$ di soluzione di coltura.

Dopo il posizionamento all'interno dei Transwell le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 . Al fine di migliorare la ricerca, si è deciso di valutare la percentuale di vitalità delle cellule a tre intervalli di tempo: 24, 48 e 72 ore. La vitalità è stata valutata mediante Alamar blue test. Inoltre per un ulteriore controllo, la percentuale di vitalità degli odontoblasti murini, a 72 ore, è stata valutata anche con il test MTT.

Il test di vitalità al reagente Alamar blue agisce come un indicatore di salute delle cellule, determinandone il potere riducente al fine di misurarne quantitativamente la capacità proliferativa, in modo da valutare la relativa citotossicità di specifiche sostanze chimiche.

In condizioni normali le cellule vitali mantengono un ambiente riducente all'interno del proprio citosol. La resazurina è il principio attivo del reagente Alamar blue; è un composto permeabile cellulare, non tossico, di colore blue non fluorescente. Una volta penetrata all'interno di una cellula vitale, viene ridotta dalla cellula stessa a resorufina,

un composto di colore rosso altamente fluorescente, aumentando in questo modo la fluorescenza complessiva dell'ambiente cellulare e il colore di supporto delle cellule circostanti.

La vitalità cellulare con Alamar blue è stata quindi valutata aggiungendo il reagente in rapporto 1:10 alla coltura cellulare ed in seguito le cellule sono state tenute in incubatore per 3-4 ore a 37°C. Il grado di fluorescenza ed i valori relativi di assorbanza sono stati quindi acquisiti tramite la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm.

Il test MTT, dove l'acronimo indica il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, invece è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano (un sale blu), conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Ciò accade prevalentemente nei mitocondri; l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, infatti è attivo infatti soltanto nelle cellule vive, e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (una sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano.

Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. Può essere utilizzato per determinare la citotossicità di farmaci o di altri tipi di sostanze chimicamente attive e potenzialmente tossiche.

Come controllo negativo, alcuni pozzetti Transwell sono stati incubati con il solo mezzo di coltura, mentre altri pozzetti sono stati preparati con una soluzione al 30% di perossido di idrogeno al fine di allestire un controllo negativo.

I dati di vitalità ottenuti per ciascun campione sono stati determinati come percentuale del controllo negativo, che è stato posto uguale al 100% di vitalità.

L'intero procedimento è stato condotto in triplicato per ogni campione di materiale testato.



Figura 12: immagine di 12 pozzetti Transwell.

5.5. ACQUISIZIONE IMMAGINI AL MICROSCOPIO A SCANSIONE LASER CONFOCALE (CLSM)

Terminate le 72 ore di esposizione delle cellule odontoblastiche ai sette materiali si è provveduto a preparare le piastre Transwell alla colorazione al fine di potere acquisire le immagini al microscopio a scansione laser confocale (CLSM).

Una volta effettuati i test di citotossicità dei diversi materiali, si è provveduto a rimuovere gli inserti Transwell e ad eliminare il terreno dalla piastra di coltura. In seguito a un abbondante lavaggio dei vetrini con il tampone Buffer-TES, contenente 5 mM di TES e 145 mM di NaCl, sono stati aggiunti 250 ml di soluzione 10 mM di PSVue per pozzetto. La piastra è stata tenuta sotto agitazione delicata per 2 ore a temperatura ambiente. A distanza di 2 ore, la soluzione 10 mM di PSVue è stata eliminata ed è stato effettuato il lavaggio della piastra con abbondante Buffer-TES.

Il colorante fluorescente PSVueTM480 consente di rilevare la presenza di cellule apoptotiche presenti in una coltura cellulare, in quanto esso tende a legare fortemente, e quindi a rendere visibile, un particolare fosfolipide di membrana, la fosfatidilserina. Quest'ultima è fisiologicamente rivolta verso il citoplasma, poiché è sottoposta ad un controllo molto severo da parte del traslocatore Flippasi, e solo in caso di eventi apoptotici tale controllo viene perso, cosicché si può trovare esposta su entrambi i lati della membrana plasmatica. Questo meccanismo risulta essere una manifestazione molto precoce dell'apoptosi, e la sua indagine consente di distinguere cellule apoptotiche in fase iniziale.

A questo punto la piastra è stata tenuta sotto agitazione delicata per 2 ore a temperatura ambiente.

Al termine delle 2 ore, la soluzione di 10 mM di PSVue è stata eliminata ed è stato effettuato il lavaggio della piastra con abbondante Buffer-TES.

Il passaggio successivo ha previsto l'aggiunta del colorante, affine al DNA per cellule vitali, Hoechst 33342. Dopo 15 minuti dall'aggiunta del colorante, sono state acquisite le immagini al microscopio a scansione laser confocale (CLSM).

5.6. ANALISI STATISTICA

La media e la deviazione standard dei valori di assorbanza, e quindi delle cellule vitali, sono stati calcolate per ogni materiale testato. I valori sono stati calcolati per ogni test effettuato, e quindi determinati per le prove a 24, 48 e 72 ore. Sono state anche descritte le percentuali di cellule vitali in rapporto alle cellule vitali presenti nel controllo, che è stato fatto corrispondere al 100%.

Le analisi sono state condotte con il software R. I valori ottenuti dalla misurazione dell'assorbanza dei i campioni sono stati analizzati statisticamente mediante una iniziale verifica della normalità della distribuzione dei dati ed una successiva analisi della varianza a una via (one-way ANOVA).

Sono stati in seguito effettuati dei confronti multipli tra i dati ottenuti dai diversi materiali testati dopo lo stesso tempo, applicando il test post-hoc di Bonferroni.

6

RISULTATI

6. RISULTATI

6.1 TEST DI CITOTOSSICITA'

La tossicità indiretta dei materiali da incappucciamento pulpale è stata valutata mediante il metodo a pozzetti Transwell. Ogni materiale è stato posizionato su un dischetto di carta, a sua volta inserito sul filtro superiore del pozzetto Transwell. Il test è stato effettuato in triplicato per ogni materiale.

La tossicità dei materiali è stata determinata usando sia il test dell'Alamar blue, con valutazioni a 24, 48 e 72 ore; sia utilizzando il Test MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) con valutazione unica a 72 ore.

Le figure 13, 14, 15 mostrano i risultati ottenuti rispettivamente a 24, 48 e 72 ore con il test all'Alamar blue. La figura 16 riassume invece la percentuale di vitalità cellulare dei materiali in tutto il periodo della ricerca.

Per quanto riguarda il test effettuato con l'Alamar blue, i risultati ottenuti a 24 ore mostrano che la percentuale maggiore di vitalità cellulare si riscontra nel Biodentine, (106%) che mostra addirittura una media di cellule maggiore rispetto al controllo, mentre il Dycal Ivory (8,6%) è il materiale che presenta i valori più bassi, così da divenire il valore minimo del range della scala dei valori di vitalità dei materiali da incappucciamento pulpale testati nella ricerca.

L'MTA-Angelus e il ProRoot MTA mostrano entrambi ottime percentuali di vitalità,

che si attestano rispettivamente sul 93,6% e sul 95%, e sembrano mostrare quindi ottime caratteristiche di biocompatibilità.

Il Calcicur, il Calcimol LC ed il TheraCal LC presentano percentuali di vitalità rispettivamente del 43%, 39%, e 41,6%, collocandosi così ad un livello intermedio, nella scala dei valori determinata dall'analisi a 24 h di tutti i materiali testati.

Per quanto riguarda la valutazione effettuata a 48 ore, dall'analisi dei campioni, emergono risultati dissimili tra i vari materiali. Alcuni di essi infatti presentano un miglioramento delle percentuali di vitalità, ed è il caso dell'MTA-Angelus, che eguaglia il numero di cellule del controllo, del Biodentine, che presenta una vitalità cellulare maggiore del 13% rispetto al controllo, e del Calcicur, che innalza i valori di vitalità cellulare arrivando al 57%.

Il Dycal Ivory, il Calcimol LC ed il ProRoot MTA si comportano in maniera opposta rispetto ai materiali precedentemente elencati; essi mostrano infatti un peggioramento dei dati nella valutazione a 48 ore, con una diminuzione dei valori medi di vitalità.

Il Dycal Ivory presenta solo il 4,6% di cellule vitali, dimostrando di avere effetti distruttivi per la vitalità cellulare.

Il Calcimol LC passa dal 39% della valutazione a 24 ore, al 31,6% durante l'osservazione a 48 ore. Anche il ProRoot MTA ha un comportamento analogo, mostrando un leggero calo delle cellule presenti nel campione, anche se la percentuale di vitalità, valutata all'85% rispetto al controllo, resta comunque ottima.

Il risultato peggiore si riscontra nei campioni preparati con il TheraCal LC, che mostrano un vero e proprio crollo della vitalità nell'intervallo che va dalle 24 alle 48 ore.

La percentuale di vitalità cellulare infatti diminuisce considerevolmente, passando dal 39 al 9,1%.

L'analisi dei campioni a 72 ore mostra un peggior comportamento generale dei materiali che porta ad una diminuzione della percentuale di vitalità e quindi del numero medio di cellule. Gli unici due materiali che fanno eccezione sono il Biodentine ed il Dycal Ivory. Il Biodentine, alla valutazione finale, si dimostra essere l'unico materiale con percentuali migliori rispetto al controllo, dimostrando così una spiccata biocompatibilità. Il numero medio di cellule rimane comunque stabile rispetto alla precedente valutazione fatta a 48 ore; con una percentuale che si stabilizza sul 114%.

Anche il Dycal Ivory registra un leggero aumento del numero di cellule, ma fermandosi al 6% dimostra di avere un comportamento sostanzialmente citotossico.

I materiali a base di MTA quali il ProRoot MTA e l'MTA-Angelus, all'analisi delle 72 ore, dimostrano di avere un leggero trend negativo, che fa sì che il numero di cellule diminuisca leggermente con il passare del tempo dopo la preparazione dei campioni; presentano comunque ottime percentuali di vitalità che si stabilizzano sul 71% per entrambi i composti e che dimostrano le ottime caratteristiche dei due prodotti.

Il CalciCur nell'analisi a 72 ore, registra un leggerissimo aumento cellulare, con valori molto simili alla valutazione precedente, ed ormai stabilizzati sull'ordine del 56% di vitalità rispetto al controllo.

TheraCal LC e Calcimol LC presentano invece sostanzialmente gli stessi valori, con percentuali molto basse valutate all'incirca sui 7 punti percentuali; con la sola differenza che il TheraCal LC mostra una netta diminuzione tra le 24 e le 48 ore, rimanendo invece stabile tra le 48 e le 72 ore; mentre il Calcimol LC presenta dei valori così bassi solo all'ultima analisi (subisce cioè un crollo della vitalità solo dopo le 48 ore).

La figura 17 mostra i risultati del test di vitalità effettuato con il colorante MTT. Il saggio conferma quasi totalmente i risultati determinati con il Test all'Alamar blue; confermando i rapporti percentuali tra i vari materiali stessi e tra i materiali ed il controllo.

L'unica differenza riscontrata rispetto al precedente test riguarda L'MTA-Angelus, che riporta le migliori percentuali di vitalità in assoluto, superiori anche a quelle del controllo e del Biodentine, che nel saggio effettuato con analisi colorimetrica a base di Alamar blue, risultava essere il materiali più biocompatibile.

In linea generale, come detto in precedenza, anche se i rapporti tra i vari materiali sono pressoché gli stessi, si registra un lieve aumento del numero medio di cellule.

Il ProRoot MTA presenta anch'esso un'indice di vitalità superiore al controllo. Il Calciur sembra confermarsi come il meno citotossico tra i prodotti a base di idrossido di calcio.

TheraCal LC e Calcimol LC mostrano percentuali che si stabilizzano intorno al 50%, ed insieme con il Dycal Ivory, che all'analisi conferma di avere il più basso indice di vitalità tra i materiali testati, si presentano come i composti con le più deficitarie caratteristiche di biocompatibilità.

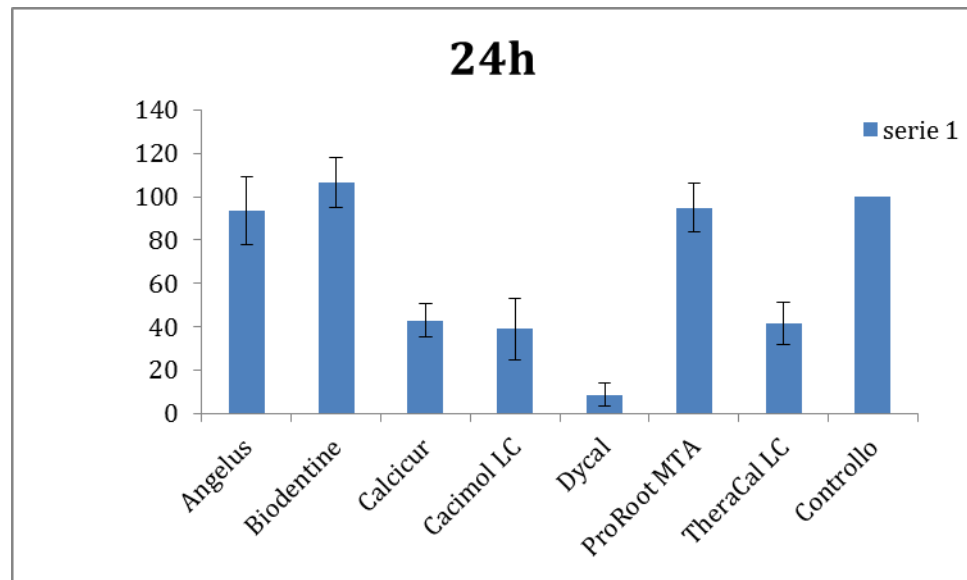


Figura 13: percentuale di vitalità delle cellule MDCP-23 a 24 h valutata con test all'Alamar blue.

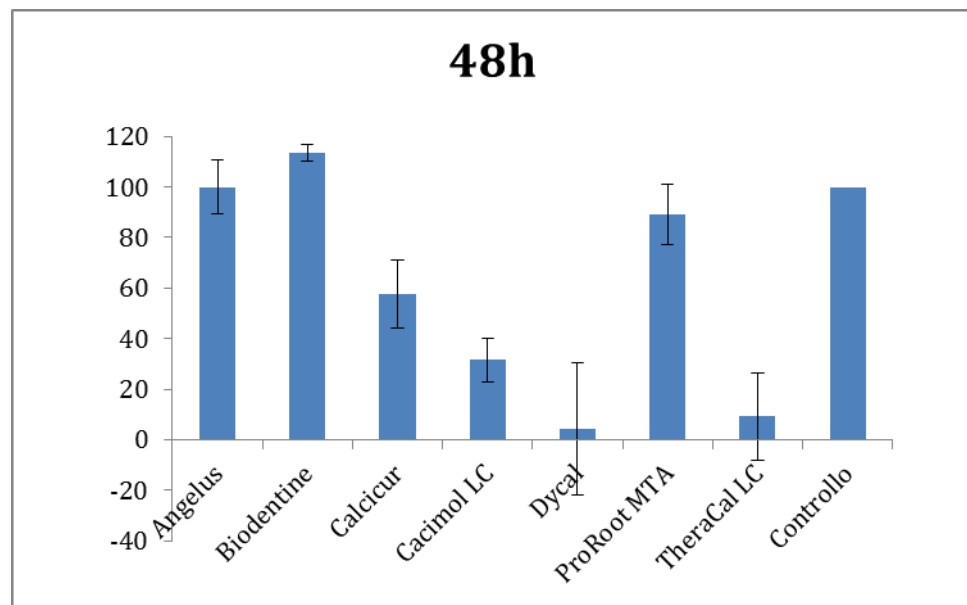


Figura 14: percentuale di vitalità delle cellule MDCP-23 a 48 h valutata con test all'Alamar blue.

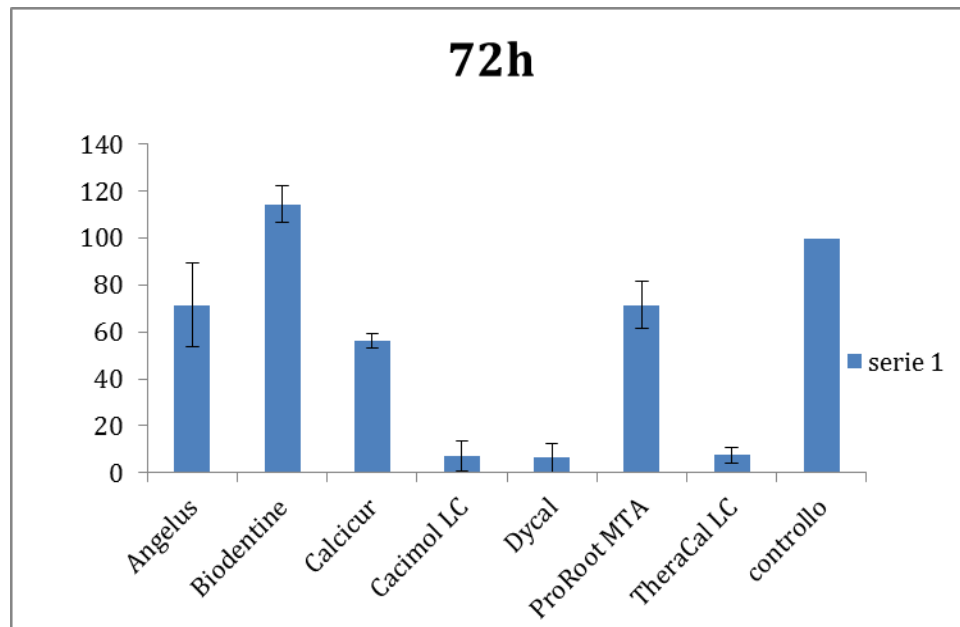


Figura 15: percentuale di vitalità delle cellule MDCP-23 a 72 h valutata con test all'Alamar blue.

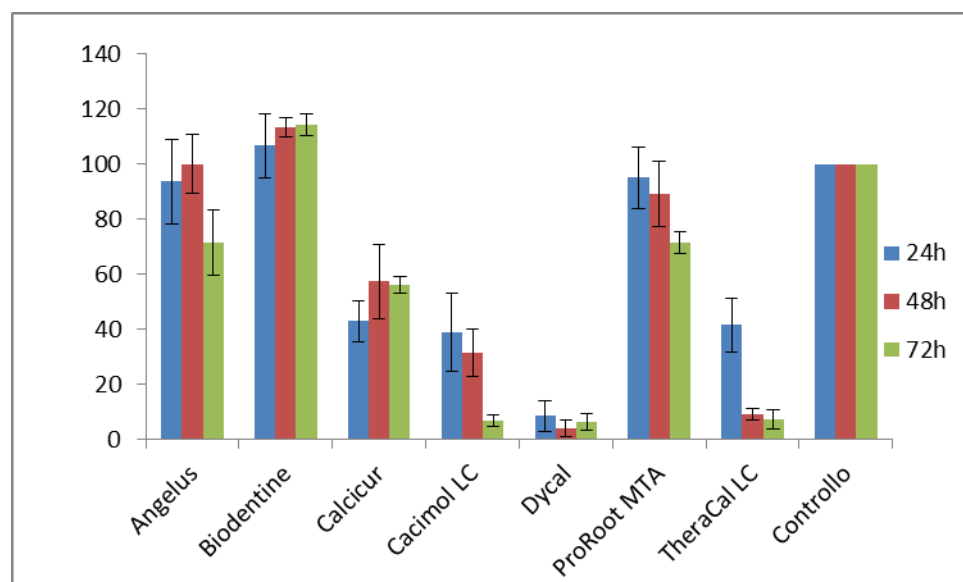


Figura 16: Il grafico riassume le percentuali di vitalità delle cellule MDCP-23 durante tutto il periodo di durata della ricerca valutate con test all'Alamar blue.

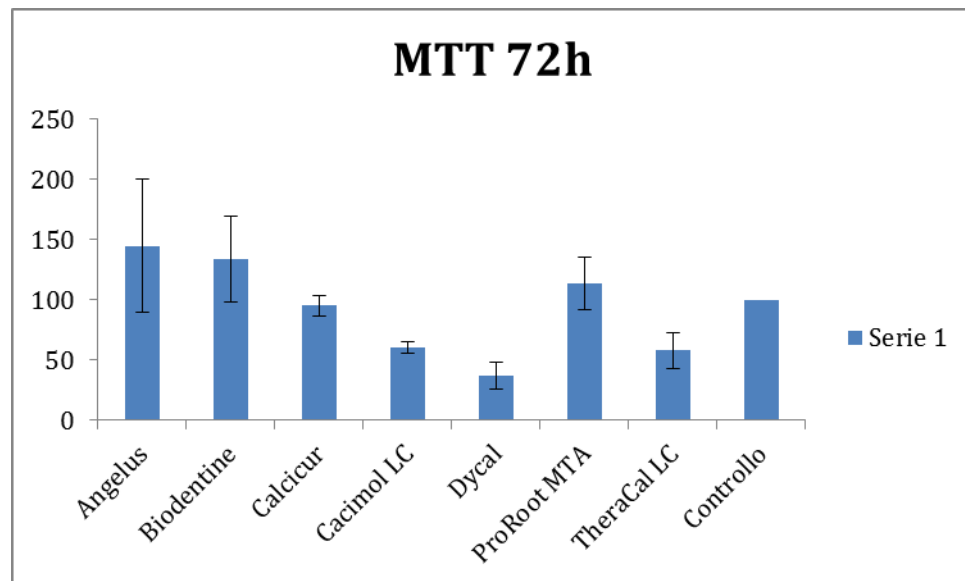


Figura 17: Il grafico mostra la percentuale di vitalità delle cellule MDCP-23 valutata a 72 h con test MTT.

6.2. ACQUISIZIONE IMMAGINI AL MICROSCOPIO A SCANSIONE LASER CONFOCALE (CLSM)

Tramite la colorazione con PSVueTM480 e Hoechst 33342 è stato possibile osservare al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) la struttura morfologica dei preparati all'interno dei pozzetti Transwell. In questo modo è stato possibile valutare precisamente il quadro istologico delle cellule MDCP-23 e distinguere abbastanza chiaramente le cellule vitali da quelle apoptotiche.

L'uso del colorante fluorescente PSVueTM480 consente di rilevare la presenza di cellule apoptotiche presenti in una coltura cellulare, poiché legandosi a specifici fosfolipidi di membrana, riesce a colorare le cellule stesse di un verde intenso. Il colorante Hoechst 33342 agisce invece legandosi al Dna delle cellule vitali e colorandone il nucleo di blu. Le figure 18 e 19 mostrano le osservazioni al confocale del controllo negativo (preparato contenente solo il medium di coltura) e del controllo positivo (preparato con perossido di idrogeno addizionata al medium di coltura). Le figure 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26 mostrano invece le immagini acquisite al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) per ogni materiale testato nella ricerca.

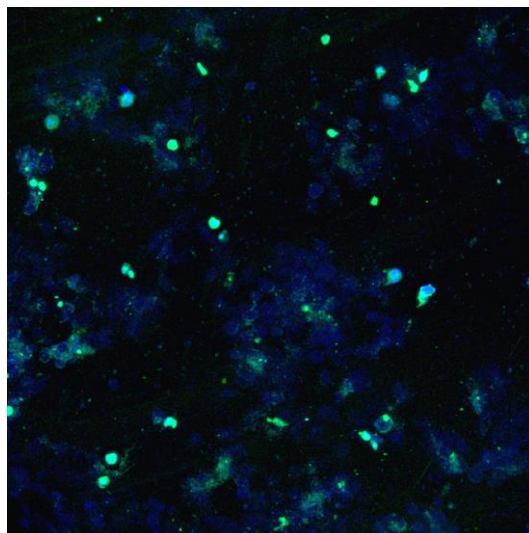


Figura 18: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare nei pozzetti Transwell in presenza del solo terreno di coltura (controllo negativo).

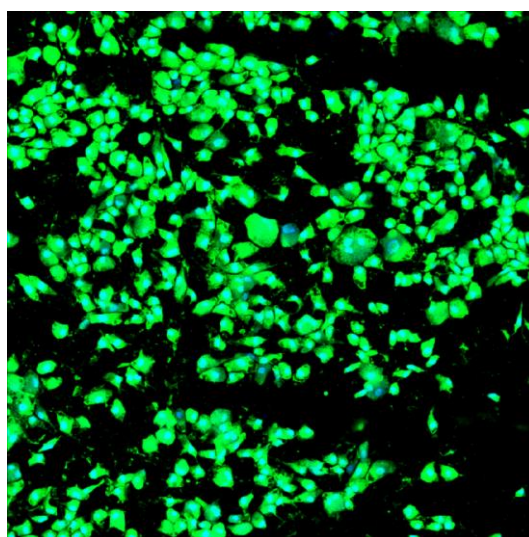


Figura 19: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare nei pozzetti Transwell in presenza di perossido di idrogeno addizionato al terreno di coltura (controllo positivo).

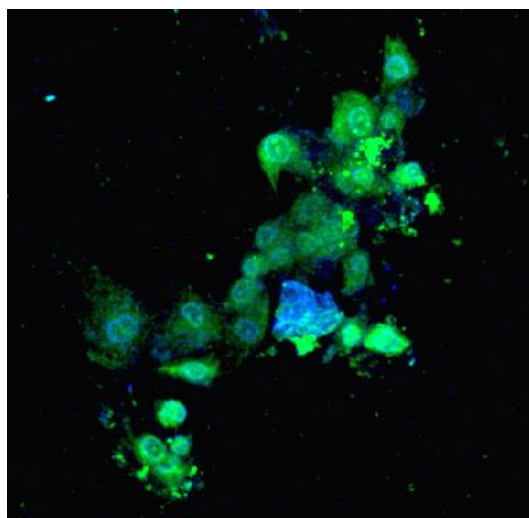


Figura 20: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare in pozzetti Transwell preparati con Dycal Ivory.

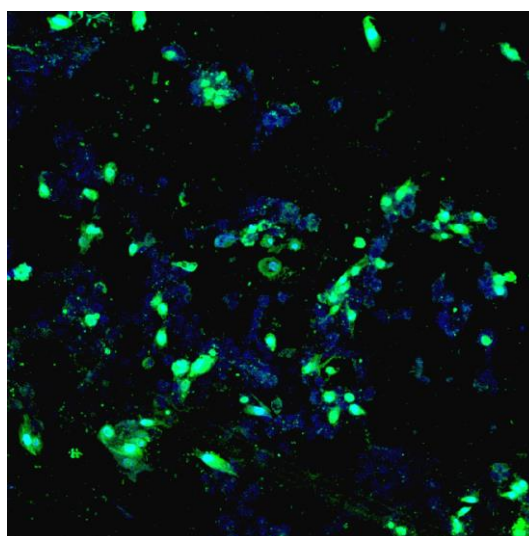


Figura 21: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare in pozzetti Transwell preparati con Calcicur.

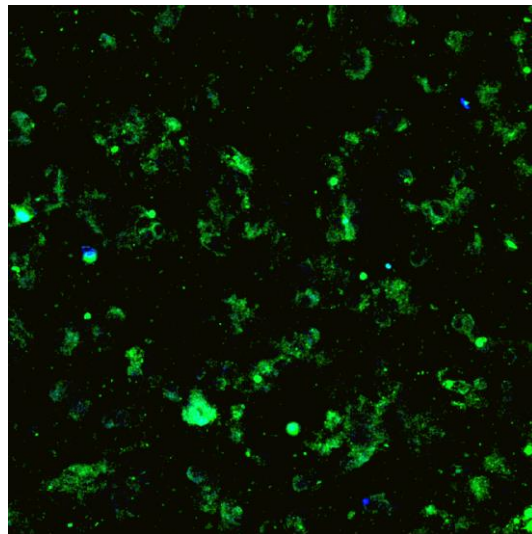


Figura 22: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare in pozzetti Transwell preparati con Calcimol LC.

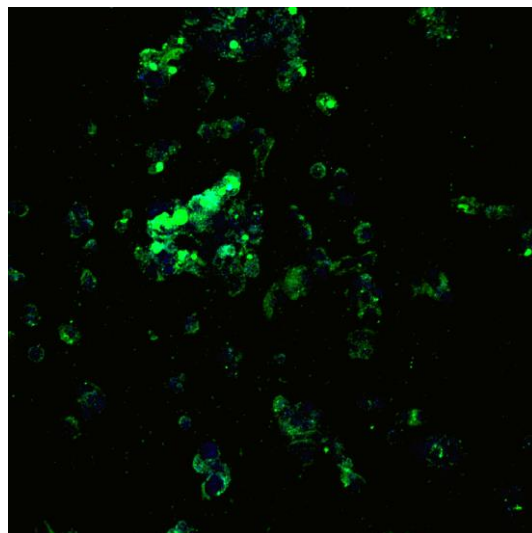


Figura 23: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare in pozzetti Transwell preparati con TheraCal LC.

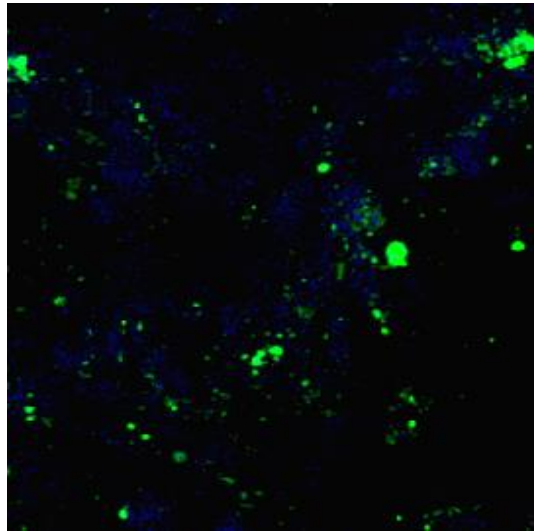


Figura 24: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare in pozzetti Transwell preparati con ProRoot MTA.

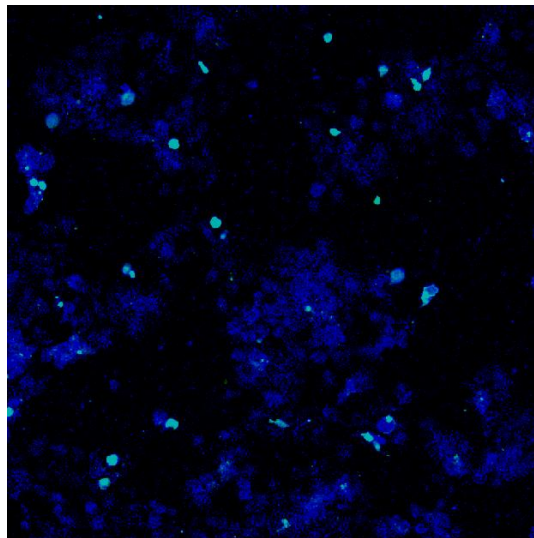


Figura 25: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare in pozzetti Transwell preparati con Biodentine.

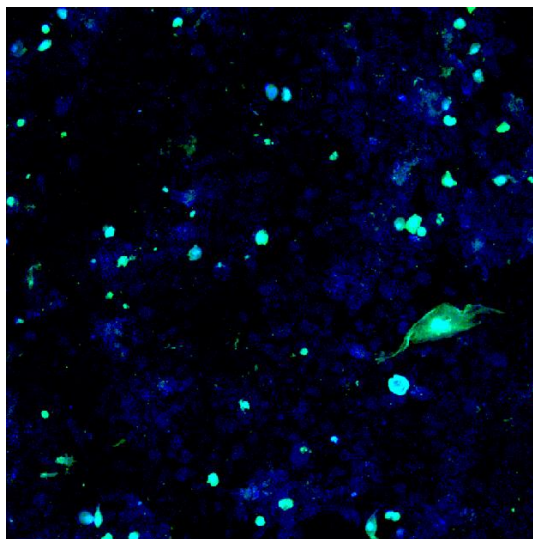


Figura 26: osservazione al microscopio a scansione laser confocale (CLSM) della vitalità cellulare in pozzetti Transwell preparati con MTA-Angelus.

6.3. ANALISI STATISTICA

Come riportato nella Tabella 3, la quantità, a 24 ore, di cellule presenti a contatto del campione di MTA-Angelus non è statisticamente differente dalla quantità di cellule presenti a contatto del campione di Biodentine, di ProRoot MTA e del controllo negativo ($P>0.001$).

Presentano invece una quantità di cellule significativamente minore dopo 24 ore i campioni di Calcimol LC, TheraCal LC e Calcicur ($P<0.001$), sebbene i tre materiali siano paragonabili tra loro sotto questo aspetto ($P>0.001$). I valori più bassi circa il numero di cellule presenti dopo 24 h è fornito nel nostro studio dal Dycal Ivory e dal controllo positivo, rappresentato dal perossido di idrogeno.

All'analisi a 48 ore non si è riscontrata una differenza statisticamente significativa tra MTA-Angelus, Biodentine, ProRoot MTA e controllo negativo ($P>0.001$). Nessuna differenza statisticamente significativa è presente anche tra i campioni di Dycal Ivory, TheraCal LC e controllo positivo ($P>0.001$), il cui numero di cellule vive è significativamente più basso rispetto ai campioni dei restanti materiali ($P<0.001$). Valori intermedi e significativamente differenti tra loro si sono ottenuti dai campioni di Calcimol LC ($P<0.001$) e Calcicur ($P<0.001$).

A 72 h i campioni ottenuti con il Biodentine hanno mostrato un numero di cellule vitali significativamente maggiore rispetto a tutti gli altri materiali testati ($P<0.001$). I campioni di Angelus e ProRoot MTA hanno mostrato valori non significativamente differenti tra loro ($P>0.001$). Il controllo positivo, pur differenziandosi sia dal Biodentine ($P<0.001$) sia da Angelus e ProRoot MTA ($P<0.001$), ha mantenuto valori

intermedi. I campioni ottenuti con il Calcicur hanno mostrato un numero di cellule vitali significativamente minore ($P < 0.001$) rispetto al controllo negativo ed a Biodentine, Mta-Angelus e ProRoot MTA.

Tra i campioni di Calcimol LC, Dycal Ivory e Theracal LC non si sono evidenziate differenze statisticamente significative ($P > 0.001$), sebbene il numero di cellule riscontrate per questi materiali sia significativamente inferiore rispetto a quello ottenuto con i materiali citati in precedenza. Nei campioni del controllo positivo sono state riscontrate il minor numero di cellule ($P < 0.001$).

Materiale	24 h	48 h	72 h
Dycal Ivory	43000 ± 2326 ^c	22000 ± 5740 ⁱ	30000 ± 1868 ⁿ
Calcicur	215000 ± 16257 ^b	300000 ± 40580 ^g	262000 ± 7454 ^m
Calcimol LC	195000 ± 27777 ^b	165000 ± 14107 ^h	33000 ± 2152 ⁿ
TheraCal LC	208000 ± 20529 ^b	48000 ± 8196 ^j	35000 ± 1193 ⁿ
ProRoot MTA	475000 ± 53675 ^a	465000 ± 55629 ^f	333000 ± 33157 ^k
Biodentine	533000 ± 60897 ^a	592000 ± 20182 ^f	533000 ± 42179 ^l
MTA-Angelus	468000 ± 72158 ^a	522000 ± 56089 ^f	333000 ± 59216 ^k
Controllo negativo	500000 ± 0 ^a	522000 ± 0 ^f	466000 ± 0 ^o
Controllo positivo (H ₂ O ₂)	37000 ± 2738 ^c	25000 ± 1850 ⁱ	18000 ± 1332 ^p

Tabella 3: Media ± deviazione standard del test post-hoc di Bonferroni dei diversi valori di vitalità cellulare in test all'Alamar Blue. Una diversa lettera all'apice del valore indica una differenza statisticamente significativa ($P < 0.001$). La presenza della stessa lettera all'apice di due valori indica una differenza statisticamente non significativa ($P > 0.001$).

I valori derivanti dall'analisi statistica del test MTT sono riportati nella tabella 4. Diversamente dai risultati precedentemente ottenuti, utilizzando l'analisi MTT si ottengono campioni con un numero di cellule vitali non significativamente differente tra Angelus, Biodentine, Calciur, ProRoot MTA ed il controllo positivo ($P > 0.001$). Valori significativamente inferiori rispetto ai precedenti campioni sono stati ottenuti con Calcimol e Theracal ($P < 0.001$), i cui campioni hanno mostrato una quantità di cellule simile ($P > 0.001$). I campioni ottenuti con Dycal hanno mostrato il più basso numero di cellule vitali ($P < 0.001$).

Materiale	MTT
Dycal Ivory	45741 ± 5040 ^s
Calciur	117778 ± 10006 ^q
Calcimol LC	75185 ± 3801 ^r
TheraCal LC	72037 ± 10783 ^r
ProRoot MTA	140741 ± 30098 ^q
Biodentine	166481 ± 59317 ^q
MTA-Angelus	179444 ± 99142 ^q
Controllo negativo	124074 ± 0 ^q

Tabella 4: Media ± deviazione standard del test post-hoc di Bonferroni dei diversi valori di vitalità cellulare in test MTT. Una diversa lettera all'apice del valore indica una differenza statisticamente significativa ($P < 0.001$). La presenza della stessa lettera all'apice di due valori indica una differenza statisticamente non significativa ($P > 0.001$).

7

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'eziologia della risposta pulpare in seguito a lesioni che ne causano l'esposizione non è ancora totalmente compresa. Vi è però un diffuso consenso generale sul fatto che il trattamento di elezione per questo tipo di lesioni, debba consentire di mantenere la vitalità dell'elemento dentario. Numerose ricerche [65] hanno dimostrato l'efficacia e le ampie percentuali di successo delle procedure di incappucciamento pulpare nel mantenere la vitalità della polpa dentale, tanto che ormai gli incappucciamenti vengono considerati come il gold standard in situazioni patologiche di questo tipologia. Tuttavia vi sono diversi fattori clinici e biologici che influenzano il buon esito della terapia [66]. In questi casi diventa quindi di fondamentale importanza la scelta del materiale da utilizzare. Idealmente i materiali da incappucciamento dentale, oltre a possedere soddisfacenti caratteristiche meccaniche e chimico-fisiche [67], devono garantire ottima biocompatibilità e, di conseguenza, basse percentuali di citotossicità, dal momento che verranno applicati per lunghi periodi di tempo a diretto contatto con la polpa dentale. Per quanto riguarda la presente ricerca, le risposte dei materiali testati, ai vari intervalli di tempo, sono state dissimili ed hanno riguardato un ampio range di risultati. Il composto che ha mostrato di avere le peggiori percentuali di vitalità è il Dycal Ivory. Il composto presenta il minor numero medio di cellule sia nel saggio colorimetrico effettuato con Alamar blue, con valutazioni a 24, 48 e 72 ore, sia nel test MTT a 72 ore. Le basse percentuali di vitalità del Dycal Ivory si manifestano già nelle prime 24 ore, e rimangono abbastanza stabili per tutta la durata della sperimentazione, manifestando soltanto piccole variazioni di 1-2 punti percentuali ai vari intervalli di misurazione.

Anche il Calcimol LC a fine ricerca dimostra di avere un indice di vitalità davvero basso, inquadrato nell'ordine del 7% all'analisi delle 72 ore. La differenza, però, rispetto al Dycal Ivory risiede nella variazione del numero di cellule ai vari intervalli di tempo. Infatti la vitalità cellulare, che a 24 ore risulta essere del 39%, subisce un piccolo abbassamento alle 48 ore, per poi calare drasticamente alla misurazione delle 72 ore, riportando un aumento spropositato di apoptosi cellulare che fa sì che la vitalità si attesti soltanto intorno al 7%. I valori di vitalità del Dycal Ivory e del Calcimol LC sono molto simili, perché identico è l'elemento chimico costituente di base; sono infatti entrambi materiali a base di idrossido di calcio. L'unico materiale, che seppur a base di idrossido di calcio, ha un comportamento differente rispetto ai precedenti è il Calcicur. Esso infatti sembra riportare risultati nettamente migliori, con una percentuale che si mantiene stabile sul 50% rispetto al controllo e che dopo un aumento alle 48 ore non subisce più modificazioni sostanziali. Pertanto il Calcicur, nella presente ricerca, sembra essere il materiale più biocompatibile tra quelli a base idrossido di calcio, seppur non riporti eccezionali risultati nell'ambito del mantenimento della vitalità cellulare. I risultati della sperimentazione avvallano quindi le tesi esposte da vari Autori [68, 69] sulla non completa biocompatibilità dei materiali da incappucciamento a base di idrossido di calcio.

In letteratura infatti è stato ormai dimostrato, che l'azione di protezione di questi materiali nei confronti dell'organo pulpare non è completa. Infatti se è pur vero che l'idrossido di calcio riveste un'importante azione nella protezione dell'organo pulpare da stimoli termici, meccanici e microbiologici [70], sia grazie alla possibilità di riuscire a promuovere la formazione di un ponte di dentina secondaria di riparazione, sia tramite l'esercizio di un'azione antibatterica, è altrettanto dimostrato il fatto che, a causa

dell'alcalinit  del proprio pH, esso, quando   in diretto contatto con la polpa dentaria, induce citotossicit , causando la formazione di uno strato di necrosi coagulativa [71].

Infatti questi materiali, non solo non agiscono come biostimolatori, ma addirittura, a causa del loro pH causano la necrosi delle cellule con cui vengono a contatto, formando uno strato necrotico (zona di cauterizzazione) di spessore variabile. La formazione di dentina riparativa, probabilmente, non   dovuta alla capacit  bioinduttiva dell'idrossido ma bens  ad un meccanismo difensivo della polpa indotto dalla natura irritante dell'idrossido di calcio [72]. Inoltre   stato provato come i materiali a base di idrossido causano un'estesa infiammazione nei tessuti con cui vengono a contatto [73] ostacolando sia la proliferazione che la differenziazione cellulare.

Molto differenti invece, si sono rivelati i risultati ottenuti dall'analisi dei materiali a base di MTA; cio  il ProRoot MTA e l'MTA-Angelus. Entrambi i materiali infatti alla valutazione delle 72 ore, sia con test all'Alamar blue che con il test MTT, hanno riportato ottime percentuali di vitalit , rilevate in un range che va dall'71 al 95% di vitalit  e che in alcuni campioni sono state addirittura assimilabili al controllo negativo.

Non vi   osservata differenza di significativit  statistica tra i valori determinati dai due materiali. L'unica differenza tra i due composti   il comportamento alla rilevazione intermedia delle 48 ore; in quanto nei campioni preparati con il ProRoot MTA, si rileva un unico trend negativo che porta ad un abbassamento leggero, ma costante, dei valori di vitalit  dalla prima rilevazione a 24 ore (95%), passando per l'analisi a 48 (89%) e 72 ore (71%).

L'MTA-Angelus, dopo la prima analisi a 24 ore che indicava un indice di vitalit  del 93,6%, ha mostrato, a differenza del ProRoot MTA, un innalzamento del numero medio di cellule tale da eguagliare i valori del controllo, per poi registrare un discreto

abbassamento che ha cristallizzato le percentuali di vitalità cellulare al 71%. Questi risultati sono in linea con studi precedenti che riportano la non citotossicità dell'MTA [74]. Questa significativa differenza tra i valori di vitalità registrati nei preparati a base di idrossido di calcio e di MTA è chiaramente inquadrabile nell'ottica della differenza strutturale dei due componenti di base e quindi delle diverse reazioni fisiologiche e biochimiche indotte sui tessuti.

È stato infatti dimostrato che l'MTA ha la capacità di indurre la formazione di un ponte di tessuto duro di maggior spessore rispetto a quello che viene costituito in presenza di idrossido di calcio, riuscendo inoltre a causare meno infiammazione nei tessuti adiacenti [75]. Per di più, l'MTA non causa la formazione dello strato necrotico peripulpare tipico dei prodotti a base di idrossido di calcio, ed è quindi facilmente intuibile come tutto ciò favorisca la guarigione delle lesioni nel pieno rispetto della biologia dei tessuti [76]

Alcuni Autori [77;78] hanno ipotizzato che l'MTA favorisca la rigenerazione dentinale in maniera più proficua rispetto ad altri materiali, grazie alla capacità di rilasciare una maggior quantità di ioni calcio a disposizione dell'organo pulpo-dentinale.

La polpa dentale contiene inoltre cellule progenitrici e staminali, che possono proliferare e differenziarsi in odontoblasti formanti dentina, Guven e Cehreli hanno asserito e riportato che, probabilmente, l'MTA è in grado di riuscire ad agevolare queste trasformazioni cellulari inducendo i tessuti pulpari alla secrezione di proteine morfogenetiche e fattori di crescita come le BMP-2 e il TGF- β 1 [79;80].

I valori ottenuti invece dall'analisi dei campioni preparati con TheraCal LC, non sono significativamente differenti da quelli del Dycal Ivory e del Calcimol LC. Le percentuali di vitalità del TheraCal LC infatti, dopo aver fatto registrare dei valori di 39 punti all'intervallo delle 24 ore, sono soggette ad un vistoso calo nelle misurazioni

successive, tanto da essere sovrapponibili a quelle dei materiali a base di idrossido di calcio. Questo risultato è abbastanza sorprendente considerando che il costituente principale del TheraCal LC è il cemento di Portland (un materiali simile all'MTA). Va comunque ricordato che ogni materiale è soggetto a delicati equilibri, ed ogni minima variazione di componenti o di composizione può causare enormi differenze tra i vari composti creati [81]; quindi soltanto la ricerca clinica e sperimentale potrà fornire un'effettiva stima delle caratteristiche del materiale analizzato [82].

Per biocompatibilità si intende la capacità di un materiale di generare una risposta ospite appropriata [83]; ciò implica che i tessuti che vengono a contatto con i materiali non devono presentare nessuna reazione tossica, irritante, infiammatoria, allergica, [84].

Secondo questa definizione, il materiale che nella presente ricerca si è rivelato più biocompatibile, è il Biodentine.

Il Biodentine, in tutte e tre le misurazioni fatte a 24, 48 e 72 ore ha riportato percentuali di vitalità superiori al controllo negativo stesso. A 24 ore ha fatto registrare valori pari al 106%, saliti al 113% e al 114% nelle due successive analisi.

Il Biodentine è un nuovo cemento bioattivo da incappucciamento pulpare, di derivazione bioingegneristica, con comportamento antiinfiammatorio a base di silicato di calcio [85].

Questo materiale, secondo recenti studi, è differente dai classici materiali a base di silicato di calcio, come ad esempio il cemento di Portland. La tecnologia alla base del processo di produzione del biosilicato attivo, principale costituente del Biodentine, fa sì che vengano eliminate le impurità metalliche presenti invece in altri cementi [86]. La reazione di presa comporta un'idratazione del silicato tricalcico, che causa la

produzione di un gel a base di silicato di calcio e di idrossido di calcio, che in contatto con ioni fosfati, è in grado di creare precipitati simili all'idrossiapatite.

Atmeh, valutando l'interfaccia tra il Biodentine e la dentina al microscopio confocale, ha dimostrato che in quella zona si verificano dei cambiamenti microstrutturali [87]. Ha osservato infatti che la dentina nella zona dell'interfaccia presentava un aumentato contenuto di carbonato: la diffusione intertubulare e l'impronta mineralizzante data dall'idratazione del Biodentine potrebbe portare alla creazione di uno strato ibrido [88].

Inoltre, valutazioni istologiche effettuate su campioni preparati con Biodentine, hanno dimostrato la capacità di questo materiale di indurre la differenziazione di odontoblasti a partire dalle cellule progenitrici pulpari. La matrice mineralizzante che ne deriva, ha le caratteristiche della dentina. [89]. I risultati della presente ricerca, sono quindi in linea con gli studi presenti in letteratura; vengono attestate quindi la biocompatibilità e la capacità bioinduttrice del Biodentine, caratteristiche che elevano il prodotto a materiale di scelta nei trattamenti di incappucciamento pulpare.

Per quanto riguarda i risultati riguardanti l'analisi citotossica dei materiali derivanti dal saggio MTT, in linea generale, i rapporti ed il trend delle percentuali di vitalità tra i vari materiali sono pressoché gli stessi, anche se si registra però un lieve aumento del numero medio di cellule dovuto al fatto che il test MTT ha una diversa specificità rispetto al test dell'Alamar blue.

Il test all'Alamar blue è infatti più sensibile, permettendo un'analisi che si spinge fino al valore limite di 50 cellule per pozzetto, e che comporta quindi una misurazione più approfondita della citotossicità nei diversi materiali.

In definitiva dalla presente ricerca si può trarre la seguente conclusione: tra i materiali testati, quello che meglio ha dimostrato di possedere le qualità e le caratteristiche che

stanno alla base della biocompatibilità è il Biodentine. La completa assenza di citotossicità e la spiccata capacità bioinduttrice sembrano indicarlo, compatibilmente al grado di sviluppo scientifico attuale, come materiale ideale per i trattamenti di incappucciamento pulpare.

Il ProRoot MTA e l'MTA-Angelus, pur non raggiungendo l'eccellenza individuata nel Biodentine, possiedono comunque un'ottima biocompatibilità, da cui deriva un effetto citotossico molto limitato, che fa sì che possano essere utilizzati senza alcun problema nella quotidiana pratica odontoiatrica.

Il CalciCur, in base ai risultati da ottenuti, sembra essere il miglior prodotto tra quelli a base di idrossido di calcio testati; ha presentato una percentuale di vitalità, che seppur non molto citotossica, non sembra al giorno d'oggi potere competere con i materiali di ultima generazione.

Dycal Ivory, Calcimol LC e TheraCal LC, hanno riportato valori dalle connotazioni citotossiche e pertanto, potendo usufruire in questo momento di materiali aventi biocompatibilità e caratteristiche molto più avanzate, se ne sconsiglia l'uso nei trattamenti clinici odontoiatrici.

Si deve comunque ricordare che, soprattutto per i materiali di nuova generazione, dovranno essere avviati ulteriori studi, che oltre a valutarne la citotossicità e la biocompatibilità, né possano dimostrare l'efficacia clinica e gli effettivi meccanismi d'azione, sia in vitro che in vivo.

8

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- 1- Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. Crit rev oral Biol Med. 1996; 7: 104-133.
- 2- Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Oppermann LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. J of Endod. 2003; 29: 324-333.
- 3- Schroder U. Effect of calcium hydroxide-containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. J Dent Res. 1985; 64: 541-548.
- 4- Yoshihara K, Yoshihara N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. J Dent Res 1996; 75: 1590-1597.
- 5- Stanley HR, Pameijer Ch. Dentistry's friend: Calcium Hydroxide. Oper Dent 1997; 22: 1-3
- 6- Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. Caries Res. 2004; 38: 314-320.

- 7- Bianchi S, Poggio C. Introduzione alla odontoiatria restaurativa. Aracne editrice, Roma, 2004.

- 8- Souza Costa C, Lopes do Nascimento A, Teixeira H, Fontana U. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dental Materials*. 2001; 17: 230–240.

- 9- Farooq N, Coll J, Kuwabara A, Shelton P. Success rates of formocresol pulpotomy and indirect pulp therapy in the treatment of deep dentinal caries in primary teeth. *Pediatric Dentistry*. 2000; 22: 278–286.

- 10- Baume L, Holz J. Long-term clinical assessment of direct pulp capping. *Int Dent J*. 1981; 31: 251–260.

- 11- Accorinte M, Loguercio A, Reis A, Muench A, Araújo V. Response of human pulp capped with a bonding agent after bleeding control with hemostatic agents. *Operative Dentistry*. 2005; 30: 147–155.

- 12- Pinto AS, de Araujo FB, Franzon R, Figueiredo MC, Henz S, Garcia-Godoy F, Maltz M. Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *Amer J of Dent*. 2006; 19: 382–386.

- 13- Marchi J, de Araujo F, Fröner A, Straffon L, Nör J. Indirect pulp capping in primary dentition: A 4 year follow-up study. *J of Clinical Pediatric Dentistry*. 2006; 31: 68–71.
- 14- Leksell E, Ridell K, Cvek M, Mejare I. Pulp exposure after stepwise versus direct complete excavation of deep carious lesions in young posterior permanent teeth. *Endod & Dent Traumatology*. 1996; 12: 192–196.
- 15- Fernandes A, Silva G, Lopes N, Napimoga M, Benatti B, Alves J. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: An immunohistochemical analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endod*. 2008; 105: 385–390.
- 16- Büyükgüral B, Cehreli Z. Effect of different adhesive protocols vs calcium hydroxide on primary tooth pulp with different remaining dentin thicknesses: 24-month results. *Clinical Oral Investigations*. 2008; 12: 91–96.
- 17- Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scandinavian J of Dent Res*. 1975; 83: 153–158.
- 18- Bjørndal L, Thylstrup A. A practice-based study on stepwise excavation of deep carious lesions in permanent teeth: A 1-year follow-up study. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1998; 26: –128.

- 19- Maltz M, Oliveira E, Fontanella V, Carminatti G. Deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study. *Caries Res.* 2007; 41:493–496.
- 20- Foreman PC, Barnes IE. A review of Calcium hydroxide. *Int Endod. J.* 1990; 23: 283-297.
- 21- Stanley HR, Pameijer Ch. Dentistry's friend: Calcium Hydroxide. *Oper Dent* 1997; 22: 1-3.
- 22- Brannstrom, M. Nyborg, H. Stromberg. Experiment with pulp capping. *Oral surg.* 1979; 48: 347.
- 23- Krell K.V; Madison S. The use of mashing gun in placing calcium hydroxide powder. *J. Endod.* 1985; 11: 233.
- 24- Fisher F.J, McCabe J.F. Calcium Hydroxide base materials. *Brit. Dent. J.* 1978; 144: 341.
- 25- Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci.* 2003; 11: 269-282.

- 26- Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 102: 680-685.
- 27- Dumsha TC, Guttman JL. Clinical techniques for the placement of calcium hydroxide. *Compend Contin Educ Dent*. 1985; 6: 482-489.
- 28- Deveaux E, Dufour D, Boniface B. Five methods of calcium hydroxide intracanal placement: an in vitro evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000; 89: 349-355.
- 29- Soares JA, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Ito IY. Elimination of intracanal infection in dogs' teeth with induced periapical lesions after rotary instrumentation: influence of different calcium hydroxide pastes. *J Appl Oral Sci*. 2006; 14: 172-177.
- 30- Deli R, Nacci A, Cherubini P. Valutazione sperimentale delle proprietà antibatteriche di alcuni cementi usati comunemente in odontoiatria. *Biomateriali*. 1987; 1: 63.
- 31- Holland R. Histochemical response of amputes pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol*. 1971; 4: 83-95.

- 32- Pereira JC, Bramante CM, Berbet A, Mondelli J. Effect of calcium hydroxide in power or in paste form on pulp-capping procedures: histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. *Oral Surg.* 1980; 50: 176-186.
- 33- Heithersay Gs. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathologiy. *J. Brit. Endod Soc.* 1975; 8: 74-93.
- 34- Freud M, Munksgaard EC. Enzymatic degradation of bis-GMA/TEGDMA polymers causing decreased microhardness ang greater wear in vitro. 1990; 98: 351-355.
- 35- Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int. Dent. J.* 2005; 55: 293-301.
- 36- Stanley HR, Pameijer Ch. Dentistry's friend: Calcium Hidroxide. *Oper Dent.* 1997; 22: 1-3.
- 37- Goldberg F, Massone EJ, Spielberg C. Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hydroxide dressing. *J. Endod.* 1984; 10: 318-320.
- 38- Hosoya N, Takahashi G, Arai T, Nakamura J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J of Endod.* 2001; 27: 343–346.

- 39- Stanley HR, Pameijer Ch. Dentistry's friend: Calcium Hydroxide. Oper Dent. 1997; 22: 1-3.
- 40- Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Oppermann LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. J of Endod. 2003; 29: 324-333.
- 41- Santos Ad, Moraes JC, Araujo EB e al. Phisico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. Int. End J. 2005; 38: 443-447.
- 42- Torabinejad M, Hong CU, Mc Donald F, Pitt Ford TR. Phisical and chemical properties af a new root-end filling material. J Endod. 1995; 21: 349-353.
- 43- Torabinejad M, Hong CU, Mc Donald F, Pitt Ford TR. Phisical and chemical properties af a new root-end filling material. J Endod. 1995; 21: 349-353.
- 44- Camilleri J, Montesin FE, Papaionnau S et al. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. Int endod. J. 2004; 37: 699-704.
- 45- Holland R, Souza V, Nery MJ et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentine tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. Braz Dent J. 2001; 12: 3-8.

- 46- Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of the calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog- part 1. *Braz Dent J.* 1996; 7: 41-46
- 47- Torabinejad M, Hong CU, Mc Donald F, Pitt Ford TR. Antibacterial effect of some root-end filling material. *J Endod.*1995; 21: 403-406.
- 48- Fridland M,Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod.* 1995; 31: 376-379.
- 49- Holland R,Souza V, Nery MJ. Calcium salts deposition in rat connective tissue after implantation of calcium hydroxide- containg sealers- *J Endod.* 2002; 28: 73-76.
- 50- Al Rabeah, Perinpanayagam H, Macfarland D. Human Alveolar bone cell interact with Pro-root and tooth colored MTA. *J Endod.* 2006; 32: 872-875.
- 51- Balto Ha. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblast to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2004; 30: 25-29
- 52- Moghaddame-Jafari S, Mantellini Mg, Botero TM, Mc Donald NJ. Effect of pro-root MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J. Endod.* 2005; 31: 387-391.

- 53- Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental material used in contemporary endodontic therapy: a review. *Int Endod J.* 2003; 36: 146-60.
- 54- Menghini P, Merlati G. Introduzione ai materiali dentari. 2004; 16: 179-180.
- 55- Mantellini MG, Botero TM, Yaman P et al. Adesive resins induce apoptosis and cell cycle arrest of pul cell. *J of Dent Res.* 2003; 82: 592-596.
- 56- Hebling J, Giro EMA, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive sistem applied to exposed human dental pulp. *J Endod.* 1999; 25: 676-682.
- 57- Huang FM, Chang YC. Citotoxicity of dentine-bonding agent of human pulp cells in vitro. *Int Endod J.* 2002; 35: 905-909.
- 58- M. MacDougall, J. K Selden, J.R. Nydegger. Immortalized mouse odontoblast cell line M06-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am. J. Dent.* 1998; 10: 11-16
- 59- C.A. De Souza Costa, M. A. Vaerten, C.A. Edwards, C.T. Hanks. Citotoxic effects of current dental adhesive system on immortalized odontoblast cell line MDCP-23. *Dent. Mater.* 1999; 24: 81-84.
- 60- H. Babich, M.C. Sinensky. Indirect cytotoxicity of dental materials: a study with tranwell inserts and the neutral red uptake assy. *After Lab Animal.* 2001; 29: 9-13.

- 61- G. Schmalz. Agar overlay method. *Inter Endo J.* 1998; 21: 59-66.
- 62- A. Wennberg, G. Hasselgren, L.A. Tronstad. A method for toxicity screening of biomaterials using cell cultured on Millipore filters. *J Biomed Mater Research.* 1997; 9: 109-120.
- 63- G. Schmalz, P Garhammer, H. Schweikl. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod.* 1996; 22: 249-252.
- 64- G. Schmalz. A cell culture method for screening the biocompatibility of dental materials. *Biomaterials, New York.* 1999; 321-323.
- 65- Briso ALF, Rahal V, Mestreneur SR, Dezan E Jr. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res.* 2006; 20: 219-225.
- 66- Cohen S, Hargreaves KM (2006) *Pathways of the Pulp*, 9th edn. St Louis, USA: Mosby.
- 67- Accorinte MLR, Holland R, Reis A et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *Journal of Endodontics.* 2008; 34: 1-6.

- 68- Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in humanteeth: a preliminary report. *Int Endod J.* 2002; 36: 225-231.
- 69- Briso ALF, Rahal V, Mestrener SR, Dezan E Jr. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res.* 2006; 20: 219-225.
- 70- Holland R. Histochemical response of amputes pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol.* 1971; 4: 83-95.
- 71- Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Brit Endod Soc.* 1975; 8: 74-93.
- 72- Goldberg F, Massone EJ, Spielberg C. Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hydroxide dressing. *J Endod.* 1984; 10: 318-320.
- 73- Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root canal-filling materials. *International Endodontic Journal.* 2003; 36: 147–160.
- 74- Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis an proliferation in vitro. *Journal of Endodontics.* 2005; 31: 387–391.

- 75- Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontics*. 1998; 24, 91-96.
- 76- Iwamoto CE, Adachi E, Pameijer CH, Barnes D, Romberg EE, Jeffries S. Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct pulp capping. *Am J Dent*. 2006; 19: 85-90.
- 77- Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2000; 26: 288-291.
- 78- Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod*. 2005; 31: 387-391.
- 79- Guven G, Cehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor b1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. *J. of Endod*. 2007; 33: 447-450.
- 80- Pistorius A, Willershausen B, Briseno Marroquin. Effect of apical root-ending filling materials on gingival fibroblast. *Int Endod J*. 2003; 36: 610-615.
- 81- Danesh G, Dammaschke T, Gerth HUV, Zandbiglari T, Schäfer. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *Int Endod J*. 2006; 39: 213-219.

- 82- Gandolfi MG, Van Landuyt K, Taddei P, Modena E, Van Meerbeek B, Prati C. ESEM-EDX and Raman techniques to study ProRoot MTA and calcium-silicate cements in wet conditions and in real-time. *J of Endod.* 2010; 36: 851–857.
- 83- Willians DF. Definitions in biomaterials. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. England co. 4, New York: Elsevier.
- 84- Valey JV, Simonian PT, Conrad EU. Carcinogenity and metallic implant. *Amer J of Orthod And Dentofacial Orthoped.* 1995; 24: 319-324.
- 85- About I, Laurent P, Tecles O. Bioactivity of biodentine: a Ca_3SiO_5 -based dentin substitute. *J. Dent Res.* 2010; 89: 165.
- 86- Koubi GF, Franquin JC, Colon P. A clinical study of a new Ca_3SiO_5 -based material indicated as a dentin substitute. *Conseuro* march 2009, Seville, Spain.
- 87- Atmeh A. Dynamic bioactive interface with dental tissue. 45th meeting of The Continental European Division of the IADR (CED-IADR) With the Scandanavian division (NOF). 2011; abstract no.1.
- 88- Colon P, Bronnec F, Grosgeat B, Pradelle-Plasse N. Interaction between a calcium silicate cement (Biodentine) and its environment. *J. Dent Res.* 2010;89 abstract no. 401.

- 89- About I. Dentin regeneration in vitro: the pivotal role of supportive cells. *Adv Dent Res.* 2011; 23: 320-324.

Ringraziamenti

Ai miei genitori: Per essere stati sempre il mio punto di riferimento, per avermi sempre incoraggiato in ogni occasione ed esperienza, per aver fatto sempre precedere l'esempio alle parole, per avermi sempre dimostrato che la vita va affrontata a testa alta a prescindere da quello che ci riserva; per avermi sempre guidato nella vita senza mai essere invadenti ed insegnato che la vera libertà deriva dalla capacità e della possibilità di poter scegliere, e infine perché, se ho raggiunto certi risultati lo devo soprattutto alla vostra caratura morale, ai vostri insegnamenti e al fatto di sapere, che comunque vada, ho alle spalle qualcosa di solido su cui contare.

A Giuseppe: per aver incarnato nello stesso tempo la figura di fratello ed amico, per essere un punto fermo della mia vita, perché ci basta uno sguardo per capirci, perché di lui mi fido incondizionatamente ed è l'unica persona su cui metterei la mano sul fuoco, e poi per avermi sempre sopportato, perché in fondo devo chiedergli scusa per anni ed anni di soprusi infantili e perché so che comunque vada mio fratello ci sarà.

Alla mia famiglia: Per essermi sempre stati vicini, per aver dimostrato in ogni momento il proprio appoggio e la propria stima, per aver messo spesso le mie esigenze davanti a tutto, perché ho capito che il fatto di essere sempre uniti non è una cosa così scontata e perché il merito è anche loro.

A Dalila: Perché non potrei desiderare una compagna di viaggio migliore, per avermi spronato, incoraggiato e trasmesso fiducia in ogni occasione, perché non mi ha fatto mai mancare il suo supporto, perché ci sei sempre stata e perché, per stare con me, ci vuole una pazienza...

Voglio ringraziare anche ***Daniele, Giuseppe, Ilario, Luigi, Topoya, Fede, Gio, Salvo, Giulia e Antonella;*** amici di una vita con cui ho condiviso tutto e il contrario di tutto. Volevo ringraziarli per tutti i momenti e le esperienze condivise, per tutti

questi anni di vera amicizia passati e per tutte le avventure e le “minchiate” fatte assieme. Perché, anche se ormai siamo un po’ sparsi per il mondo, quando ci ritroviamo è come se non ci fossimo mai lasciati, ed infine perché il fatto che oramai siamo cresciuti e laureati, in fondo, non implica che bisogna diventare persone serie...

A Ciccio: *per essere stato il fratello maggiore che non ho mai avuto, per aver condiviso gran parte dei nostri traguardi universitari, per le partite alla play, a basket e a calcetto, per il tuo andamento ciucco molleggiante, pirchi sù un pinnaruni, e perché so che su di te posso sempre contare.*

Ad Anna: *perché sei come una sorella per me, perché in questi anni, ogni qual volta avevo bisogno ci sei sempre stata, per essere stata la mia estetista/ cuoca/ preparatrice personale, per avermi quasi adottato in casa e perché se ho passato biochimica una buona parte del merito è tua.*

A Serena: *perché in questi anni ne abbiamo passate di tutti i colori, ma abbiamo affrontato insieme ogni problema; perché ti voglio un bene dell’anima, per tutte le notti preesami passate a studiare, per le tue battute idiote, perché sei Sandrina e per essere l’unica persona che conosco capace di paccare con una facilità disarmante.*

A Kevin: *perché sei una bellissima persona ed un vero amico, per le lezioni di spagnolo impartite sul campo, per le notti in tenda e sul materassino, per le cene infinite, perché quel venerdì pomeriggio ci ha un po’ cambiato la vita e perché sei l’unico capace di dormire dentro una banca.*

A Dinho: *perché la nostra è un’amicizia vera, per questi bellissimi anni passati insieme al Cardano, per le partite, le notti passate a parlare, per essere stato un grande vicino di camera, anche se non mi facevi mai dormire a causa del continuo rumore, perché fondamentalmente siamo cresciuti insieme, per la famosa rincorsa verso l’arbitro e per il tuo vizietto di farmi trovare l’ambulanza in collegio.*

Al Collegio Gerolamo Cardano: *per aver rappresentato per me una seconda famiglia, per avermi fatto crescere e maturare, per avermi dato la possibilità di vivere*

esperienze incredibili, conoscere gente fantastica, perché sono orgoglioso di averlo rappresentato, perché mi ha fatto comprendere la potenza e la bellezza di far parte di un gruppo di persone che condividono gli stessi valori, per avermi insegnato che l'università è una palestra di vita, e che spesso lo studio è solo una parte minoritaria; per tutte le partite giocate e le emozioni, perché qui dentro ho passato i migliori anni della mia vita e perché il Cardano è una delle poche cose capaci di provocarmi i brividi in ogni momento.

A Greta: *perché è una cara amica ed una delle più belle persone che conosco, perché non è facile trovare una persona di tale cultura ed etica, per tutti gli anni passati insieme ma anche per capacità di cambiare idea 50 volte al minuto, per la festa del fraccaro di qualche anno fa, per le continue paranoie, le partite a biliardino e naturalmente i gavettoni.*

Jack, Gesù, Gerry, Criscito: *perché siete veramente dei bravi ragazzi e un gruppo affiatato, per tutte le serate da matricola, per i materassi volati giù, per l'idrante sempre aperto, per l'ingenuità violata, per le partite con la squadra di basket e perché spero in fondo di avervi insegnato qualcosina...*

A Pepito, Ficarra, Flo e Shi: *perché dopo aver conosciuto Gerry credevo di aver visto tutto nella vita, e invece siete arrivati voi; un finto dottore ma vero pompiere, un futuro avvocato che vuole fare l'economista, una psico-spugna-rumena mezza lucana e mezza tedesca, ed una bergamasca che è più terrona di me. Perché, con voi, davvero non c'è stata occasione di annoiarsi e perché non vedervi a tutte le ore del giorno e della notte mi mancherà un casino...*

A Cate, Billy, Franco, Flash, Fabbri, Spina, Bosco, Vige, Lilla, Isa, Johny, Floris e tutti gli altri ragazzi del collegio, per gli incontri ravvicinati con rettori del terzo tipo, per le discussioni di grande spessore morale in corridoio e perché con tutti questi personaggi, l'impressione è quella di trovarsi costantemente in mezzo ad uno show.