



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

Archive ouverte UNIGE

<https://archive-ouverte.unige.ch>

Thèse

2005

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Evaluation des propriétés biologiques et de scellement de 4 matériaux endodontiques

Galgano, Camillo Michaele

How to cite

GALGANO, Camillo Michaele. Evaluation des propriétés biologiques et de scellement de 4 matériaux endodontiques. Doctoral Thesis, 2005. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:703

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:703>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:703](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:703)

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DE MEDECINE
Section de Médecine dentaire
Département de Thérapeutique buccale et d'Orthodontie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Ivo KREJCI et du
Docteur Serge BOUILLAGUET, Privat-docent

**EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES
ET DE SCHELLEMENT DE 4 MATERIAUX
ENDODONTIQUES**

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Camillo GALGANO

de

Rome / Italie

Thèse N° 636

GENEVE

2005

Je désire adresser mes vifs remerciements au professeur Ivo KREJCI qui m'a fait l'honneur de présider à cette thèse.

Cette thèse a été préparée sous la direction du Docteur Serge BOUILLAGUET, privat-docent, MER, que je remercie tout spécialement.

J'associe également à mes remerciements :

- *Le Docteur John WATAHA, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Augusta, USA, pour sa collaboration*
- *Madame Huguette HERNOUX, secrétaire du Professeur Ivo KREJCI, pour la mise en page et la dactylographie du texte*
- *Tout le personnel du Laboratoire de la Division du Professeur Ivo KREJCI pour sa collaboration*
- *Toute l'Ecole de Médecine dentaire de l'Université de Genève pour m'avoir donné cette opportunité*

RESUME

Les buts de cette étude étaient de comparer les propriétés biologiques et de scellement de 4 ciments d'obturation canalair. Un matériau de type oxyde de zinc eugéol (PCS), une résine époxy (TS), une résine méthacrylate (REZ) et un silicone (RSA) ont été évalués. Pour le test de cytotoxicité, les matériaux ont été mis immédiatement après malaxage ou après un délai de 24h en contact avec des fibroblastes en culture. Les altérations métaboliques des cellules en culture ont été observées à différents intervalles de temps et quantifiées à l'aide du test MTT. Des racines humaines ont été obturées à l'aide de ces matériaux et soumises à un test d'infiltration utilisant le complexe LPS-rhodamine comme traceur. L'absence d'étanchéité a été mise en évidence à l'aide d'un microscope confocal. Les résultats ont démontré une toxicité marquée pour les matériaux fraîchement malaxés avec une tendance à l'aggravation avec le temps. De plus, aucun des matériaux testés n'a permis d'obtenir un scellement canalair efficace en raison des nombreuses variations observées entre les différents échantillons. Cependant, le matériau de type silicone (RSA) a démontré les meilleures propriétés biologiques et de scellement comparativement aux autres ciments testés.

INTRODUCTION

Une obturation étanche du système canalaire, après désinfection et mise en forme, et l'absence de toute interaction biologique défavorable entre le ciment d'obturation et les tissus péri-apicaux sont deux conditions qui contribuent au succès d'un traitement endodontique (SCHILDER 1967, SAUNDERS & SAUNDERS 1994).

Parmi les différents ciments endodontiques disponibles sur le marché, on distingue les ciments à base d'oxyde de Zinc-eugénole (ZnO), ceux à base d'hydroxyde de calcium Ca(OH)_2 , ceux à base de verres-ionomères et ceux à base de monomères résineux.

Les ciments à base de ZnO ont été utilisés pendant plusieurs années mais certains travaux indiquent qu'ils peuvent libérer de l'eugénole qui est irritant pour les cellules vivantes (HUME 1986, SCHMALZ et coll. 2000, HUANG et coll. 2002). Bien que les ciments à base de Ca(OH)_2 aient démontré des propriétés biologiques intéressantes, ces ciments ont cependant l'inconvénient de se dissoudre dans les tissus avec le temps (HOVLAND & DUMSHA 1985). Pour les matériaux à base de verres-ionomères, certains travaux ont mis en évidence que ces ciments peuvent stimuler la libération de PGE2 dans des cultures de fibroblastes humains (WILLERHAUSEN et coll. 2000). Si les ciments à base de résine sont caractérisés par une excellente stabilité dimensionnelle, en revanche, la toxicité mais également la mutagenicité des ciments à base de résines sont bien documentées (SCHWEIKL et coll. 1998, HUANG et coll. 2002). De ce fait, leur utilisation en tant que ciment d'obturation canalaire reste controversée. Plus récemment, des matériaux à

base de silicone ont été développés et les résultats cliniques préliminaires obtenus avec ces nouveaux ciments sont encourageants (HUUMONEN et coll. 2003, WU et coll. 2002). Cependant, leurs propriétés biologiques restent peu étudiées.

Les ciments endodontiques sont généralement utilisés en association avec un cône de gutta-percha destiné à condenser le ciment sur les parois canalaires. Néanmoins, plusieurs études ont confirmé que l'étanchéité canalairre obtenue avec la technique d'obturation mixte n'est pas toujours satisfaisante. Ce manque de scellement a été démontré à l'aide de tests d'infiltration utilisant des colorants, des fluides, des bactéries ou des radio-isotopes comme traceurs (WU et coll. 1993, CANALDA-SAHLI et coll. 1992). Cependant, la majorité des traceurs utilisés pour ces tests d'infiltration sont différents en taille et en forme comparativement aux bactéries et aux endotoxines susceptibles de pénétrer l'interface matériau-dentine radiculaire et d'altérer le processus de guérison clinique (CHAVEZ DE PAZ et coll. 2003). Dans une revue de littérature récente, HILTON (2002) a démontré que les traceurs utilisés dans les tests conventionnels surestimaient ce problème d'infiltration en raison de leur faible poids moléculaire. De ce fait, la validité de ces tests d'infiltration reste controversée (WU & WESSELINK 1993). BARTHEL et coll. (1999) ont comparé les résultats de tests bactériologiques avec les résultats de tests d'infiltration réalisés à l'aide de colorants et ont démontré une absence de corrélation entre les deux méthodes d'évaluation.

COLEMAN (1995) a utilisé le LPS (lipopolysaccharide) afin d'évaluer l'étanchéité de couronnes scellées et a démontré que l'infiltration

du LPS peut avoir lieu après 2 semaines. LAGHIOS et coll. (2000) ont également employé le LPS pour évaluer les propriétés de scellement de matériaux endodontiques. Leurs résultats, basés sur une analyse SDS page, ont démontré que les ciments d'obturation canalaire n'empêchaient pas l'infiltration du LPS. Puisque le LPS constitue un important facteur de virulence des bactéries gram-négatives et qu'il influence le succès clinique de la thérapie endodontique, sa pénétration au niveau de l'interface matériau d'obturation-dentine radiculaire devrait être totalement proscrite (STASHENKO et coll. 1998).

La microscopie confocale est une technique d'analyse non-destructive qui permet d'obtenir des images à haute résolution, à partir de la sub-surface d'échantillons de tissus minéralisés ou non minéralisés, et aussi de détecter la fluorescence de certains marqueurs situés à l'intérieur des tissus (WATSON et coll. 2000). Du fait que le LPS peut être marqué à l'aide de cytochromes fluorescents et donc observé en microscopie confocale, sa détection dans les canaux radiculaires obturés permettrait d'améliorer la qualité de l'évaluation des propriétés de scellement de nouveaux matériaux endodontiques.

Les buts de cette étude étaient :

- 1) d'évaluer la cytotoxicité de 4 ciments endodontiques à l'aide de cultures de fibroblastes
- 2) de comparer les propriétés de scellement de ces ciments en employant la microscopie confocale et le LPS comme traceur.

MATERIEL ET METHODES

Les quatre ciments endodontiques évalués dans cette étude étaient :

- Pulp Canal Sealer (Lot numéro : 9-1067; Kerr Hawe, Bioggio, Suisse), ciment à base d'oxyde de zinc-eugenol (PCS)
- RSA Roeko Seal Automix (Lot numéro : 2110841; Roeko, Langenau, Allemagne), matériau silicone (RSA)
- Top Seal (Lot numéro : 0111001685; Dentsply Detrey, Konstanz, Allemagne), résine epoxy (TS)
- Endo Rez (Lot numéro : 4D89; Ultradent Product Inc., South Jordan, EU d'Amérique), résine méthacrylate (REZ)

Test de cytotoxicité

Les matériaux ont été préparés selon les recommandations du fabricant, dans des conditions d'asepsie afin d'éviter tout risque de contamination biologique pendant le test de cytotoxicité (WATAHA et coll. 1992). Brièvement, les matériaux ont été condensés dans un moule de Téflon (1 mm d'épaisseur et 10 mm de diamètre) et recouverts sur chaque face par des feuilles de Mylar. Conformément aux normes ISO (ISO 10993), le rapport entre la surface des échantillons et le volume du milieu de culture était de 1.88 cm²/mL. Les échantillons ont été placés en contact avec des monocouches de fibroblastes juste après durcissement (Fresh conditions). Un deuxième ensemble d'échantillons a été incubé à 37°C pendant 24 heures avant d'être mis en contact avec les cultures cellulaires. Cette

dernière condition permet de simuler l'interaction matériau-cellules observée cliniquement après durcissement.

Pour les tests de cytotoxicité, les matériaux ont été mis en contact direct avec les fibroblastes Balb/c 3T3 de souris (ATCC CCL 163, clone A31, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM en présence de 5 % FCS, 25 mmol/L de tampon HEPES, 1 µg/mL de gentamycine, 125 unités/mL de pénicilline, 125 µg/mL de streptomycine et 2 mmol/L de glutamine (Oxoid, Bale, Suisse). Vingt-quatre heures avant le début du test, les cellules ont été réparties dans des plaques de 24 puits (Costar, Cambridge, MA, USA) à une concentration de 25000 cellules par puits (1 mL de milieu par puits). Les cellules ont été incubées à 37⁰C dans un environnement de 5 % CO₂ et 95 % air pour permettre aux fibroblastes d'adhérer au fond des puits.

La cytotoxicité a été évaluée à plusieurs intervalles de temps (24h, 48h, 7j) en quantifiant l'activité mitochondriale des cellules en culture par la méthode du MTT (WATAHA et coll. 1992). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de l'activité enzymatique mesurée en présence d'échantillons de Téflon (contrôle négatif). Pour chaque condition de test, 4 échantillons ont été utilisés. Les différences statistiques entre les matériaux ont été testées à l'aide de tests de comparaison multiples (ANOVA et Tukey $\alpha=0.05$).

Test d'infiltration

Vingt canines et prémolaires extraites (degré de courbure 15 à 35°) ont été sélectionnées en vue de la réalisation d'un test d'étanchéité. Chaque dent a été sectionnée au niveau de la jonction cémento-amélaire afin d'obtenir des racines de 10 mm de longueur. Les racines ont été préparées à l'aide du système ProTaper (Maillefer, Ballaigues, Suisse) à une vitesse de rotation de 600 tr/min sous une irrigation constante avec NaOCl 3% (10 ml). La mise en forme finale du canal avait une conicité de 6° et un diamètre apical de 0.30 mm. Les canaux ont ensuite été rincés à l'eau distillée (10 ml), séchés à l'alcool et obturés à l'aide de ciments canalaires et de cônes acryliques (Taille M, Lot numéro: 0202 BF; Produits Dentaires, Vevey, Suisse). Les cônes acryliques ont été utilisés car les résultats préliminaires ont démontré que les cônes de gutta-percha sont auto-fluorescents lorsqu'ils sont observés au microscope confocal.

Pour le test d'infiltration, le Lipopolisaccharide (LPS) marqué à l'aide de TRITC (tetramethylrhodamineisothiocyanate) a été utilisé comme marqueur. En résumé, des solutions de TRITC ont été préparées par mélange de 1.5 mg de TRITC-LPS (Sigma, Suisse) avec de l'eau bidistillée pour obtenir une solution avec une concentration de 0.01 mg/ml.

Un isolant (vernis à ongles) a été appliqué sur la partie extérieure des racines pour empêcher la pénétration du marqueur à travers la dentine et les échantillons immergés dans la solution durant 48 heures. Tous les échantillons ont ensuite été rincés à l'eau distillée, enrobés dans la résine époxy auto-polymérisante (Epofix, Struers, Suisse), puis sectionnés (Isomet,

Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) perpendiculairement à l'axe de la racine de façon à obtenir des tranches de 0.5 mm d'épaisseur. Les tranches ont été observées sous un microscope confocal CLSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). La présence de TRITC-LPS à l'intérieur des canaux a été détectée avec un laser HeNe vert à 543 nm. Les paramètres du microscope (faisceau laser, vitesse de balayage, résolution, détecteur) ont été maintenus constants.

Des images numériques de 564 x 564 pixels ont été enregistrées en utilisant une vitesse de 1.69 s/scan. Pour l'analyse, les images ont été importées sur Adobe Photoshop (San Jose, CA), vues à un grossissement de 200 % et l'intensité du colorant de la rhodamine quantifiée en utilisant la fonction histogramme. Le maximum d'intensité de couleur rouge a été détecté à l'extérieur de chaque racine tandis que le centre du cône acrylique représentait le minimum d'intensité (noir). L'intensité relative de LPS-rhodamine a été calculée en divisant l'intensité du rouge observé à l'interface ciment-dentine par la différence entre l'intensité extérieure et l'intensité au centre du cône.

Les échantillons ont été observés à trois niveaux de distance depuis l'apex de la dent (< 1mm, 1-2 mm, >2-3 mm de l'apex). Pour chaque niveau, la moyenne a été calculée et comparée à l'aide des tests de comparaisons multiples ANOVA et Tukey ($\alpha=0.05$).

RESULTATS

Cytotoxicité

Les résultats du test de cytotoxicité ont démontré que les composants relâchés par certains ciments endodontiques ont entraîné des altérations métaboliques des cellules en culture. Les figures 1 et 2 illustrent ces résultats exprimés en pourcentage de l'activité enzymatique des cellules contrôles (Teflon). Pour les ciments fraîchement malaxés (Fresh conditions), seul le matériau RSA a présenté des propriétés biologiques favorables, voire même équivalentes à celles du matériau de contrôle. Les matériaux PCS, TS et REZ ont, pour leur part, entraîné une réduction d'environ 60 % de l'activité enzymatique des cellules en culture et étaient tous significativement plus toxiques que le matériau RSA ($P < 0.05$), à tous les intervalles d'observation. De plus, tous les matériaux étaient plus toxiques une semaine après leur malaxage qu'au début du test (24 et 48 heures). A 7 jours, l'activité enzymatique des cellules exposées au RSA avait chuté de 35 % en moyenne et d'environ 90 % pour les autres matériaux.

Pour les matériaux testés 24 heures après leur malaxage (Set conditions), les résultats du test de toxicité étaient comparables à ceux observés avec les matériaux fraîchement malaxés mais avec une tendance plus marquée à la stabilité dans le temps. Seul le matériau REZ a entraîné une suppression totale de l'activité métabolique après 48h post-malaxage. Le RSA a montré une légère tendance (non significative) à l'aggravation.

Test d'infiltration

Les images obtenues avec le microscope confocal ont permis de mettre en évidence le manque d'étanchéité des différents ciments testés (Fig. 2). En moyenne, tous les matériaux ont montré une infiltration importante malgré de larges différences parmi les échantillons du même groupe (Fig. 3 à 6). L'observation en fonction de la distance avec la partie apicale des échantillons était également extrêmement variable. Seul, le matériau RSA a démontré une infiltration de LPS significativement réduite (ANOVA, Tukey, $\alpha = 0.05$) par rapport aux autres matériaux testés et ce indépendamment du niveau d'observation.

DISCUSSION

La biocompatibilité des ciments endodontiques est un facteur primordial dans le succès du traitement endodontique car ces matériaux peuvent entrer en contact direct avec les tissus peri-apicaux au cours de leur utilisation (BARTHEL et coll. 1998). Les résultats de cette étude montrent que tous les ciments endodontiques, à l'exception du RSA, posent de sérieux risques biologiques, en particulier, juste après malaxage (Fig. 1). Ce comportement est en contraste avec le comportement d'autres matériaux comme les résines composites (WATAHA et coll. 1999), les alliages métalliques (NELSON et coll. 1999) et les céramiques (MESSER et coll. 2003). Cependant, cette tendance à une toxicité augmentée dans le temps n'a pas été

observée pour les matériaux durcis depuis 24 heures (Fig. 1). Ce résultat pourrait indiquer que les matériaux mis en contact avec les cultures de cellules après un certain temps de latence libèrent moins de composants toxiques dans le milieu de culture.

RSA a été le moins cytotoxique (Fig. 1) et a présenté les meilleurs résultats du point de vue du scellement canalaire, ce qui est en accord avec des études précédentes (OZTAN et coll. 2003). De plus, la formulation chimique du RSA (silicone) constitue une nette amélioration par rapport aux autres matériaux compte tenu du fait que les silicones sont compatibles avec les résines composites et qu'ils n'interfèrent pas avec leur polymérisation (TJAN & NEMETZ 1992). La toxicité accrue du matériau REZ, observée après 24 heures, pourrait s'expliquer par une diffusion massive de monomères résiduels non-polymérisés.

La technique du microscope confocal utilisée dans cette étude pour évaluer l'infiltration du LPS représente une amélioration importante par rapport aux méthodes conventionnelles tel que la microscopie optique utilisée en combinaison avec la fuchsine, le bleu de méthylène, le nitrate d'argent (HILTON 2002). Un avantage remarquable, cette technique est représentée par la capacité d'observer la sub-surface des échantillons à l'abri des artefacts de surface liés à la préparation des coupes. En outre, la liaison chimique entre le LPS et la rhodamine atteste de la pénétration du LPS lorsque le signal fluorescent est détecté sans pour autant réduire sa capacité de pénétration par une augmentation excessive de la taille du marqueur. Un autre avantage réside dans la possibilité de procéder à une évaluation semi-quantitative de la pénétration du marqueur par la mesure de la fluorescence

de la surface extérieure de la racine et de celle du cône acrylique. L'utilisation du vernis à ongles pour empêcher la pénétration latérale des LPS dans les canaux fut efficace comme le démontrent certaines images (Fig. 3A, 4A, 5A, 6A) qui ne présentent aucune trace d'infiltration. Cette observation est en accord avec des précédents rapports (LAGHIOS et coll. 2000). Si l'utilisation des cônes acryliques peut être critiquée en raison de leur faible pouvoir condenseur comparativement aux cônes de gutta-percha, en revanche il est important de noter que ces derniers avaient une conicité égale à celle de la préparation (6° de conicité). De ce fait, les risques de sous-condensation ont pu être partiellement éliminés. Les scores d'infiltration utilisés dans cette étude ont pris en compte le degré de pénétration maximum (fluorescence maximale du complexe LPS-rhodamine) pour évaluer la pénétration du LPS. Même si ce mode de calcul peut surévaluer les résultats, il représente le maximum de concentration de LPS auquel les tissus peuvent être exposés *in vivo*.

Aucun ciment n'a été capable de sceller complètement l'apex et d'éviter la pénétration du LPS (fig. 3 à 6). Ceci confirme les difficultés existantes en endodontie dans les étapes de préparation et d'obturation qui pourraient être attribuées à d'autres facteurs tels que la mise en forme du système canalaire ou l'anatomie du système canalaire. Le RSA était le plus prometteur à cet égard (Fig. 2) car l'infiltration était la plus faible et la moins variable parmi les spécimens observés.

Les matériaux à base d'eugénol tel que PCS qui ont démontré des propriétés cliniques satisfaisantes mais un comportement *in vitro* relati-

vement défavorable devraient être mis en relation avec leur capacité à relâcher des agents thérapeutiques tels que l'eugéno1 (HUME, 1988).

Les ciments à base de résine, utilisés comme matériaux d'obturation canalaire, posent de nombreux problèmes. Ils sont difficiles à éliminer en cas de ré-intervention, présentent des qualités biologiques insuffisantes et ne permettent pas d'améliorer la qualité du scellement. En ce qui concerne ce dernier point, il est important de rappeler que les résines subissent des variations dimensionnelles importantes au cours de leur polymérisation et que la configuration du canal radicaire représente un élément aggravant (BOUILLAGUET et coll. 2003). De plus, la région apicale des dents humaines représente une structure anatomique extrêmement variable qui risque d'entraver le succès d'un traitement endodontique basé sur la pénétration des résines à l'intérieur des tubuli dentinaires (MJÖR et coll. 2001).

CONCLUSION

Les résultats du test de cytotoxicité ont permis de mettre en évidence les risques biologiques associés à l'utilisation des ciments à base d'oxyde de zinc-eugénol et des matériaux d'obturation résineux. Les résultats du test d'infiltration basé sur la détection du complexe LPS-rhodamine à l'aide du microscope confocal a, pour sa part, démontré le manque d'étanchéité de certains matériaux d'obturation canalair. Seul le matériau RSA a démontré des propriétés biologiques et de scellement satisfaisantes qui devraient être confirmées par des études *in vivo*. Sur la base de ces résultats, il est également préconisé d'apporter des modifications majeures aux formulations des ciments d'obturation canalair résineux afin de garantir toutes les qualités nécessaires à une obturation canalair de qualité.

REFERENCES

BARTHEL C.R., MOSHONOV J., SHUPING G., ORSTAVIK D.

Bacterial leakage versus dye leakage in obturated root canals.

Int Endod J **32** : 370-375, 1999

BOUILLAGUET S., TROESCH S., WATAHA J.C., KREJCI I., MEYER J.M., PASHLEY
D.H.

Microtensile bond strength between adhesive cements and root canal dentin.

Dent Mater **19** :199-205, 2003

CANALDA-SAHLI C., BRAU-AGUADE E., SENTIS-VILALTA J., AGUADEBRUIX S.

The apical seal of root canal sealing cements using a radionuclide detection technique.

Int Endod J **25** : 250-60, 1992

CHAVEZ De PAZ L.E., DAHLEN G., MOLANDER A., MOLLER A., BERGENHOLTZ G.

Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after anti-microbial endodontic treatment.

Int Endod J **36** : 500-508, 2003

COLEMAN A.J.

Macromolecular leakage beneath full cast crowns. Part I: The diffusion of lipopolysaccharide and dextran.

J Prosthet Dent **74** :187-197, 1995

HILTON T.J.

Can modern restorative procedures and materials reliably seal cavities? *In vitro* investigations. Part 2.

Am J Dent **15** : 279-289, 2002

HOVLAND E.J., DUMSHA T.C.

Leakage evaluation in vitro of the root canal sealer cement Sealapex.

Int Endod J **18** : 179-82, 1985

HUANG F.M., TAI K.W., CHOU M.Y., CHANG Y.C.

Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells.

Int Endod J **35** : 153-158, 2002

HUANG T.H., YANG J.J., LI H., KAO C.T.

The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro.

Biomaterials **23** :77-83, 2002

HUME W.R.

The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol.

J Am Dent Assoc **113** : 789-791, 1986

HUME W.R.

In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol.

Int Endod J **21** :130-134, 1988

HUUMONEN S., LENANDER-LUMIKARI M., SIGURDSSON A., ORSTAVIK D.

Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: a comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer.

Int Endod J **36** : 296-301, 2003

LAGHIOS C.D., CUTLER C.W., GUTMANN J.L.

In vitro evidence that lipopolysaccharide of an oral pathogen leaks from root-end filled teeth.

Int Endod J **33** : 333-339, 2000

MESSER R.L., LOCKWOOD P.E., WATAHA J.C., LEWIS J.B., NORRIS S.,

BOUILLAGUET S.

In vitro biological response to dental ceramics.

J Prosthet Dent **90** :452-458, 2003

MJÖR I.A., SMITH M.R., FERRARI M., MANNOCCI F.

The structure of dentine in the apical region of human teeth.

Int Endod J. **34** : 346-353, 2001

NELSON S.K., WATAHA J.C., NEME A.M., CIBIRKA R.M., LOCKWOOD P.E. Cyto-
toxicity of dental casting alloys pretreated with biologic solutions.

J Prosthet Dent **81** : 591-596, 1999

OZTAN M.D., YILMAZ S., KALAYCI A., ZAIMOGLU A.

A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers.

J Oral Rehabil **30** : 426-429, 2003

SAUNDERS W.P., SAUNDERS E.M.

Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy : a
review.

Endod Dent Traumatol **10** : 105-108, 1994

SCHILDER H.

Filling root canal in three dimensions.

Dent Clin North Am **11** : 723-744, 1967

SCHMALZ G., HOFFMANN M., WEIS K., SCHWEIKL H.

Influence of albumin and collagen on the cell mortality evoked by zinc
oxide-eugenol in vitro.

J Endod **26** : 284-287, 2000

SCHWEIKL H., SCHMALZ G., FEDERLIN M.

Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test.

Clin Oral Investig **2** : 125-129, 1998

STASHENKO P., TELES R., D'SOUZA R.

Periapical inflammatory responses and their modulation.

Crit Rev Oral Biol Med **9** : 498-521, 1998

TJAN A.H., NEMETZ H.

Effect of eugenol-containing endodontic sealer on retention of prefabricated posts luted with adhesive composite resin cement.

Quintessence Int **23** : 839-844, 1992

WATAHA J.C., CRAIG R.G., HANKS C.T.

Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity.

Dent Mater **8** : 65-70, 1992

WATAHA J.C., RUEGGERBERG F.A., LAPP C.A., LEWIS J.B., LOCKWOOD P.E.,

ERGLE J.W., METTENBURG D.J.

In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva.

Clin Oral Investig **3** : 144-149, 1999

WATSON T.F., AZZOPARDI A., ETMAN M., CHENG P.C., SIDHU S.K.

Confocal and multi-photon microscopy of dental hard tissues and biomaterials.

Am J Dent **13** (Spec Issue) :19D-24D, 2000

WILLERSHAUSEN B., MARROQUIN B.B., SCHAFFER D., SCHULZE R.

Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines.

J Endod **26** : 703-707, 2000

WU M.K., De GEE A.J., WESSELINK P.R., MOORER W.R.

Fluid transport and bacterial penetration along root canal fillings.

Int Endod J **26** : 203-208, 1993

WU M.K., TIGOS E., WESSELINK P.R.

An 18-month longitudinal study on a new silicon-based sealer, RSA Roeko Seal: a leakage study in vitro.

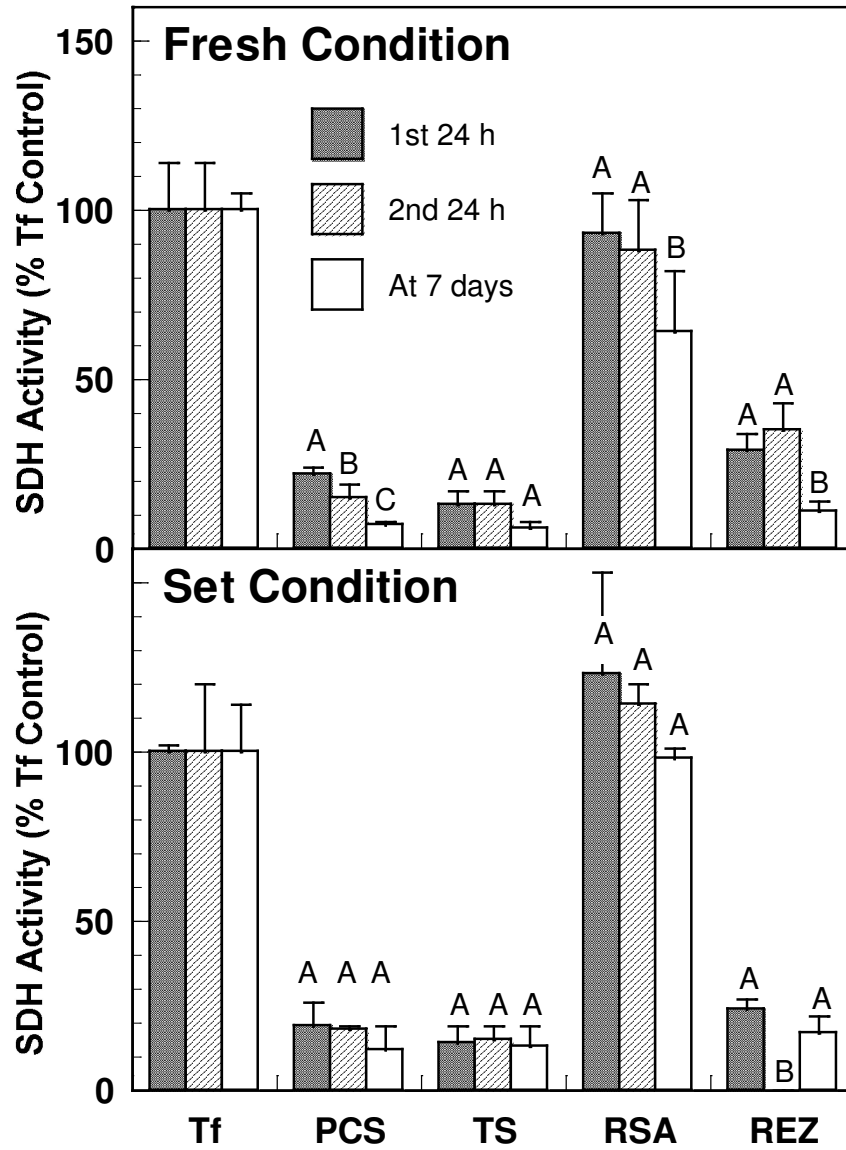
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **94** : 499-505, 2002

WU M.-K., WESSELINK P.R.

Endodontic leakage studies reconsidered. Part 1. Methodology, application and relevance.

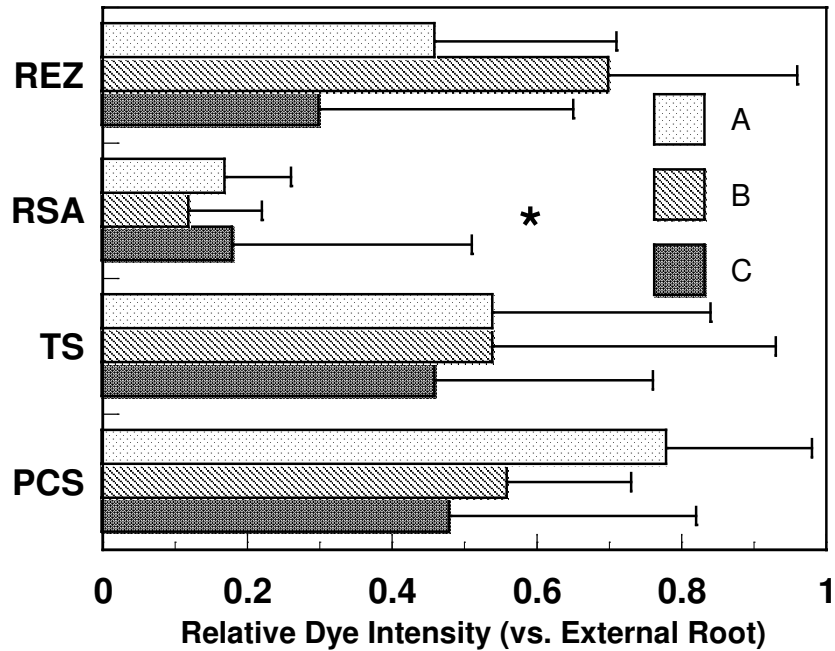
Int Endod J **26** : 37-43, 1993

Figure 1



Cellular response to endodontic sealers placed immediately in contact with cultured cells (Fresh condition) or 24h after setting (Set Condition), initially (1st 24h), after 24h (2nd 24h) and after one week of storage in sterile PBS (At 7 days). Cellular response was measured in terms of succinic dehydrogenase (SDH) activity, expressed in terms of Teflon (Tf) negative controls. Error bars indicate 1 standard deviation of the mean (n=4). Within each set of columns, different letters indicate statistical differences (ANOVA, Tukey, $\alpha = 0.05$).

Figure 2



LPS-rhodamine penetration inside the root canal at level A (< 1 mm from the apex), level B, (1-2 mm from the apex) and level C (2-3 mm from the apex). The relative intensity of LPS-rhodamine leakage was estimated by dividing the intensity of the rhodamine at the interface between the sealer and the acrylic cone by the difference between the external intensity and that in the center of the cone. Because there was large variations among teeth, ANOVA and Tukey post-hoc comparisons ($\alpha = 0.05$) did not show statistical differences between the three locations from the apex. The RSA material was more effective in sealing root canals against LPS leakage than any other material (statistically significant, ANOVA, Tukey, $\alpha = 0.05$).

Figures 3 A and 3 B

Endo Rez specimens. Confocal micrograph (3A) showing a section of the root canal treatment after the leakage test (original magnification X 10). The micrograph shows the presence of rhodamine-LPS at the external surface of the root (top left) and the absence of dye penetration (arrows) at the interface between the sealer and the acrylic cone whereas the rhodamine-LPS dye has penetrated into the porosities of the resin sealer (3B).

Figures 4 A and 4 B

RSA Roeko Seal specimens. The CLSM images (original magnification X 10) show no penetration of rhodamine-labeled LPS (arrows) in micrograph 4A and the presence of dye around the acrylic cone in micrograph 4B.

Figures 5 A and 5 B

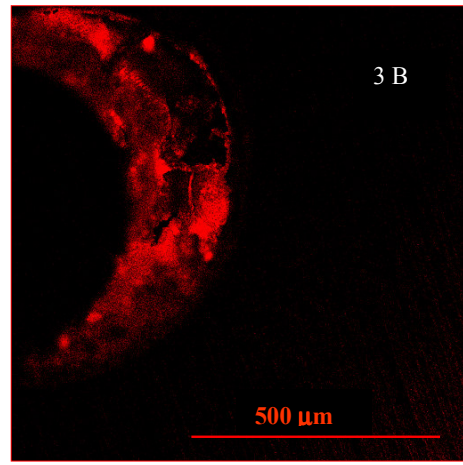
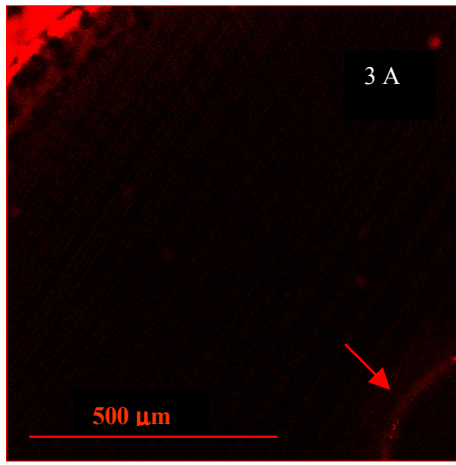
Top Seal specimens (original magnification X 10). Confocal micrograph 5A shows the presence of rhodamine-LPS at the external surface of the root (top left) and the absence of dye penetration (arrows) at the interface between the sealer and the acrylic cone. In micrograph 5B, the dye is observable in the isthmus of the root canal exhibiting a defective sealing.

Figures 6 A and 6 B

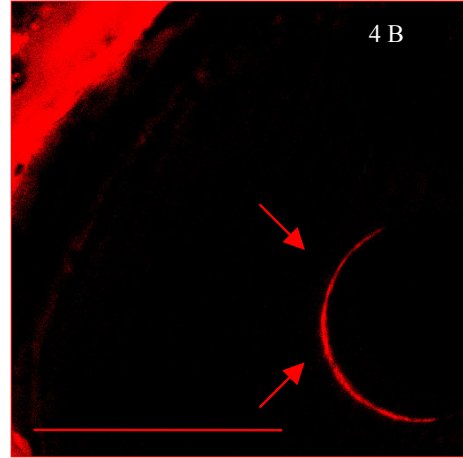
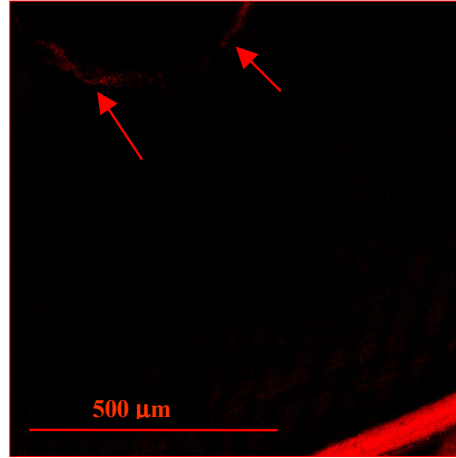
PCS specimens (original magnification X 10). Micrograph 6A shows the presence of rhodamine-LPS at the external surface of the root (bottom left)

and the no rhodamine-LPS penetration (arrows). In micrograph 6B, the dye is observable at the interface between the sealer and the dentin.

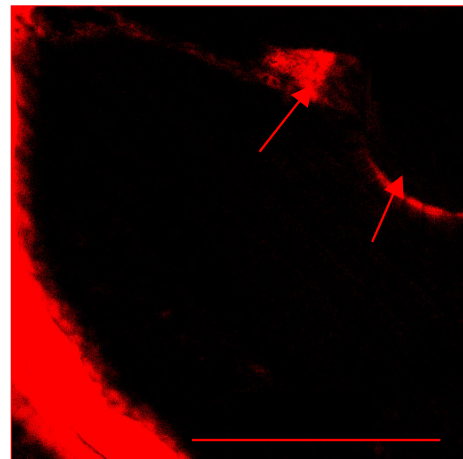
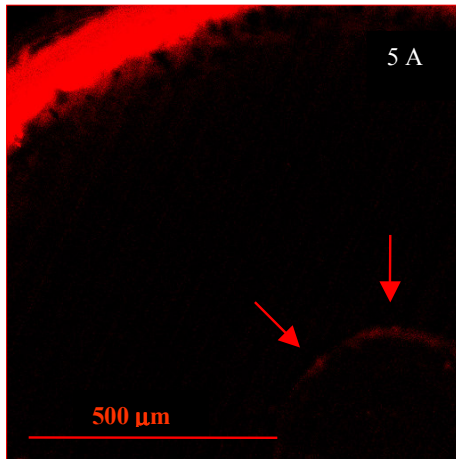
REZ



RSA



TS



PCS

