NILTON AZAMBUJA JUNIOR

**Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade da mistura da clorexidina com
hipoclorito de sódio sobre diferentes linhagens celulares**

São Paulo
2012

NILTON AZAMBUJA JUNIOR

Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade da mistura da clorexidina com hipoclorito de sódio sobre diferentes linhagens celulares

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Azambuja Junior, Nilton.

Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade da mistura da clorexidina com hipoclorito de sódio sobre diferentes linhagens celulares / Nilton Azambuja Junior : orientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2012.

65 p.: fig., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de concentração - Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida.

1. Endodontia. 2. Preparo do canal radicular. 3. Cultura de células. 4. Clorexidina. 5. Hipoclorito de sódio I. Marques, Marcia Martins. II. Título.

Azambuja, N. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da mistura de Clorexidina com Hipoclorito de Sódio sobre diferentes linhagens celulares. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a minha mãe, **Marilda Ribeiro de Camargo**, que é a grande responsável por todos os ensinamentos e princípios adquiridos ao longo da vida.

Sempre serei extremamente grato por tudo que fez por mim.

Ao meu irmão **Alberto**. Grande parceiro e melhor amigo que pude encontrar na vida. Mesmo distante e a me contrariar sempre, ainda me coloca no rumo correto.

Ao Dr. Oswaldo Bergamaschi por ser meu compasso na vida Odontológica, minha inspiração como dentista e minha meta de nunca parar de estudar, nunca.

À minha mulher, **Helena**, idealização imortal de paz. Como a eternidade, também possui a paciência de me ajudar a enfrentar os desafios por toda a vida. Muito Obrigado por aceitar e entender minhas divergências e ausências. Me ensinou que tudo que foi necessário abrir mão para que essa fase fosse realizada é apenas um reflexo da vida e seus desafios.

Ao meu querido **Mathias** por trazer luz e esperança ao meu mundo.

Ao meu querido **Prof. Bombana**, in memoriam, que sempre serviu de compasso moral na vida acadêmica e sempre esteve presente para uma dúvida ou diálogo.

À todos meus grandes amigos **Leo, Eric, Bruno, Douglas e Thayse** dentre outros que serviram de locomotiva me puxando ou empurrando para enfrentar todas as batalhas.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora mais que especial Profa. Dra. **Márcia Martins Marques**, pela amizade ao longo de todos estes anos, por ser minha inspiração inicial no mundo da pesquisa desde 1996 ao plantar a semente da curiosidade científica. Por servir de modelo de como um pesquisador deve ser e transmitir seus conhecimentos livremente a toda comunidade, só temos a agradecer.

Aos amigos **Leila, Thiago e Guilherme** da Pós-graduação, sem os quais o curso de Doutorado e esse trabalho não seriam possíveis.

Aos Professores **Giulio Gavini** e **Manoel Eduardo Lima Machado** por todos seus ensinamentos na Endodontia desde a Graduação até as oportunidades oferecidas na Disciplina.

Aos meus queridíssimos amigos da vida acadêmica da FOUSP por tudo muito obrigado: **Simone Moretto, Cácio, Mariana, Talita, Ivana, Roberta e Fernando** dentre muitos outros.

Aos colegas da USP, Professores e funcionários, muito obrigado!

Aos alunos de graduação e pós-graduação. Muita calma pessoal!

Aos colegas mestrandos e doutorandos. Muitos momentos de alegria não foram esquecidos!

À CAPES pela bolsa de doutorado.

RESUMO

Azambuja, N. Avaliação da Citotoxicidade e genotoxicidade da mistura de Clorexidina com Hipoclorito de Sódio sobre diferentes linhagens celulares [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

O uso de irrigação com solução de hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) seguida de irrigação final com solução de clorexidina a 2%(CHX) pode promover uma melhor antissepsia do sistema de canais radiculares do que as abordagens tradicionais. Já foi relatado que estas substâncias quando entram em contato dentro do sistema de canais radiculares produzem subprodutos a partir de sua mistura, que apresentam uma fase líquida e uma fase sólida precipitada que permanece nas paredes do canal radicular. Sua ação citotóxica em cultura de células ainda não foi estudada. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito desta mistura e seus subprodutos *in vitro* sobre a viabilidade celular. Para avaliar se o grau de diferenciação pode afetar a sobrevivência celular foram escolhidas para o experimento fibroblastos de gengiva humana (FMM1) que são células mais diferenciadas e células-tronco de polpa dentária humana (PDH3) menos diferenciadas. Métodos: partes iguais de soluções de hipoclorito 1% (NaOCl) e digluconato de clorexidina 2% (CHX) foram misturadas e os subprodutos obtidos. Os grupos experimentais testados foram: G1- CHX, G2- NaOCl + CHX(fase líquida), G3- NaOCl + CHX(fase sólida). Quatro(4) diferentes concentrações (100%, 1%, 0,5% e 0,25%) das substâncias de G1 e G2 e do meio de cultivo condicionado pelo G3, foram aplicadas às culturas de células. A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de redução do MTT (n=24/concentração/substância/células) e a genotoxicidade através de contagem de micronúcleos apenas para as concentrações das substâncias de 0,5% e 0,25% (número de micronúcleos/1000 células em cada contagem, 2 contagens), ambos em 24 horas após o contato de 15 minutos com as substâncias testadas. Os dados foram analisados por ANOVA complementado por teste de Tukey(p<0,05) para o MTT e qui-quadrado para genotoxicidade. Como resultados da viabilidade celular a dose letal de 50%(DL50) ocorreu apenas nas concentrações menores que 5% no G1, e ao redor de 1% para G2 e G3. Como resultados do teste de genotoxicidade os mesmos números de micronúcleos foram encontrados para todos os grupos em

duas contagens de 1000 células. As células PDH3 apresentaram maior viabilidade que a FMM1 com maior número de células em concentrações maiores das substâncias testadas, demonstrando maior resistência de células menos diferenciadas. Como não houve diferença estatística no número de micronúcleos entre os grupos do teste de genotoxicidade inferimos que não houve aumento do número de micronúcleos entre os grupos de teste e o controle. Portanto, a solução de CHX a 2% quando aplicada sobre as células em cultura *in vitro* não foi biocompatível em concentrações de diluição acima de 0,5%; não foi genotóxica, pois não houve aumento na formação de micronúcleos nem com o grupo da clorexidina nem com a fase líquida da mistura ou com o precipitado.

Palavras-chave: Endodontia. Preparo de Canal Radicular. Técnicas de Cultura de Células. Viabilidade Celular. Clorexidina. Hipoclorito de Sódio .Testes para Micronúcleos.

ABSTRACT

Azambuja, N. Evaluation of the Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate and its Effect on Cytotoxicity and Genotoxicity of cell cultures [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

New antimicrobial therapies have been introduced in Endodontics for periapical lesions and treatment-resistant infections. Alternating irrigating solutions such as 1% sodium hypochlorite (NaOCl) solution and 2% chlorhexidine (CHX) solution has shown promising results. However, inside the root canal system the NaOCl and CHX interact producing byproducts (Bps) represented by a liquid (Liq) and a solid precipitated (Sol) that remain on the canal walls. Objectives: To study the cytotoxicity of such Bps and CHX using cultured fibroblasts (FMM1) and stem cells(PDH3). Two cell lines were chosen to test if different differentiated cell types would present different survival results. Methods: Equal parts of 1% NaOCL and 2% CHX solutions were mixed and the Bps were obtained. Three drug solutions were tested: cell culture medium dilution of CHX, cell culture medium dilution of Liq and cell culture medium conditioned by the Sol byproduct. They were prepared in fresh medium in 4 different concentrations (100%, 1%, 0,5%, 0,25%) and applied to the cells for 15 minutes. In the control wells the cells grew on fresh medium. Cytotoxicity was measured by using the MTT reduction assay in 24 replicates per concentration per solution. Twenty-four hours later cell viability was analyzed. Micronucleus counting was used to check genotoxicity (number of micronucleus/ 1000 cell, 2 counting). Data was evaluated through ANOVA test with post hoc Tukey($p < 0,05$) for MTT assay and qui-square for genotoxicity. Lethal dose concentration 50%(LD50) was obtained in concentrations less than 0,5% with CHX and around 1% for Liq and Sol. there were obtained same number of micronucleous for all the substances tested. PDH3 cells presented higher survival rate to higher concentrations, so they were more resistant than FMM1. There was no statistical difference between control and tested groups for genotoxicity. 2% CHX solution when applied to cell cultures was not biocompatible in concentrations above 0,5%; there is no increase in micronucleous number with tested substances.

Keywords: Biocompatibility. Cell culture. Chemical. Endodontics and Fibroblasts.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	ácido cítrico
AM	ácido maleico a 7%
Ca	cálcio
CaOH	Hidróxido de cálcio
CHX	Digluconato de clorexidina 2%
CtB	citocalasina B
DMEM	Dulbeco's modified Eagle medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)
DPSCs	células-tronco polpa dentária pós natal (<i>dental pulp stem cells</i>)
FMM1	Linhagem de células fibroblásticas de gengiva oral humana
g/ml	gramas por mililitro
hDPSCs	células-tronco polpa dentária humana
DL50	Dose letal mínima de 50%
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
Liq	fase líquida da mistura da solução de hipoclorito de sódio a 1% com solução de clorexidina a 2%
mg/ml	miligrama por mililitro
mM	milimolar
Mn	Micronúcleo
MTA	agregado de trióxido mineral (<i>Mineral Trioxide Aggregate</i>)
NaOCl	hipoclorito de sódio 1%
NaOH	hidróxido de sódio

NEAA	aminoácidos não essenciais (<i>non essential aminoacids</i>)
nM	nanomolar
nm	nanometros
PCA	para-cloroanilina
PCGH	para-clorofenilguanidil-1,6-diguanidil-hexano
PCU	para-clorofenil uréia
PDH3	Linhagem células-tronco de polpa dentária adulta humana
PSG	penicilina-estreptomicina-glutamina
RNA	ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
SFB	soro fetal bovino
Sol	fase sólida da mistura da solução de hipoclorito de sódio a 1% com solução de clorexidina a 2%
μg	micrograma
μg/ml	micrograma por mililitro
μl	microlitro
μM	micromolar
μm	micrometros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICE.....	61
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

O desafio da Endodontia moderna é o tratamento da periodontia apical e sua prevenção (Caldeira, 2012). O sucesso do tratamento endodôntico advém da sanificação e remoção de todos os microrganismos e detritos do interior do sistema de canais radiculares. Todos os dias são encontradas novas espécies de microrganismos mais resistentes ao tratamento convencional ou ao retratamento endodôntico. Um dos maiores problemas é o tratamento de dentes com necrose pulpar e lesões periapicais porque o índice de falhas neste tipo de tratamento é maior do que nos casos sem lesão periapical. Nos dentes com lesão periapical crônica, há grande número de bactérias anaeróbias disseminadas ao longo de todo o sistema de canais, túbulos dentinários, crateras apicais e lacunas no cimento, incluindo grande concentração no biofilme apical bacteriano.

As bactérias alojadas no sistema de canais radiculares desempenham um papel importante no desenvolvimento e manutenção de lesões periapicais, sendo a eliminação dos microrganismos um dos principais objetivos do tratamento endodôntico. Em um processo infeccioso de longa duração, as bactérias podem se propagar para ramificações, reentrâncias, istmos, deltas apicais e túbulos dentinários. Situadas nestas regiões, elas podem não ser afetadas pelos instrumentos e substâncias utilizados no preparo químico-mecânico. Como estas áreas não são atingidas na instrumentação, o uso de farta irrigação com substância químicas e medicação intracanal é recomendado para ajudar na eliminação destas bactérias e aumentar a chance de sucesso.

Novas terapias antimicrobianas em Endodontia são necessárias para aprimorar as já existentes e conseguir sucesso onde não se consegue resolução no tratamento.

Ainda não se tem uma substância ou um medicamento que reúna totalmente as condições ideais, mas os principais requisitos são: dissolução tecidual, capacidade antimicrobiana, biocompatibilidade, largo espectro de ação, atividade prolongada, permeabilidade, não manchar as estruturas dentárias, não ser alergênico, e ser de fácil remoção.

A escolha de uma substância química auxiliar deve atender a alguns requisitos biológicos também. Entre estes, destaca-se a compatibilidade com o

tecido do hospedeiro, de tal forma que o sucesso seja alcançado por uma reparação biológica através da manutenção da vitalidade das células envolvidas no processo de cicatrização, e a sua capacidade antimicrobiana.

Quanto maior a concentração da substância, maior será a sua efetividade antimicrobiana e, também, sua toxicidade em relação aos tecidos periapicais. Essa relação deve ser levada em consideração na escolha da substância irrigadora, optando por substâncias cuja concentração permitam uma maior biocompatibilidade, sem interferir em sua atividade antimicrobiana.

O hipoclorito de sódio é o padrão ouro como solução irrigadora na antisepsia do sistema de canais. Mas uma substância alternativa tem sido estudada como irrigante e medicação intracanal, a clorexidina (CHX), por possuir ação antimicrobiana imediata, amplo espectro antibacteriano sobre bactérias Gram positivas e negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos, especialmente a *Candida albicans*. A CHX possui relativa ausência de toxicidade, capacidade de adsorção pela dentina e lenta liberação da substância ativa, o que prolonga sua atividade antimicrobiana residual. O digluconato de CHX é um dos melhores agentes antimicrobianos encontrados na manutenção da saúde oral devido à sua substantividade.

A utilização da solução de hipoclorito de sódio em associação com a CHX vem sendo preconizada durante o preparo químico-cirúrgico, para potencializar a sanificação do sistema de canais radiculares.

Entretanto, estas soluções irrigantes quando entram em contato, formam compostos solúveis e um precipitado insolúvel, que requerem observações específicas frente à sua utilização.

Na Literatura foi relatado que os subprodutos desta mistura são carcinogênicos e citotóxicos (Brum, 2012; Chhabra, 1991; Chhabra, 1990; Kacmar, 1995).

Este trabalho teve por objetivo avaliar os subprodutos desta mistura e da CHX através de cultura de células. Analisando a viabilidade celular e a genotoxicidade tentou-se encontrar justificativa ou contra indicações para o uso destas substâncias e sua interrelação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste estudo tentamos buscar respostas para as dúvidas a respeito da biocompatibilidade da interação entre as substâncias químicas hipoclorito de sódio e CHX utilizadas em endodontia para desinfecção do sistema de canais. Os métodos do estudo envolveram cultura de células com ensaios de proliferação e teste de genotoxicidade com as substâncias testadas. Esta revista da Literatura abordará estes tópicos para maior clareza e entendimento.

2.1 Endodontia e preparo químico do sistema de canais

A principal meta da endodontia é a desinfecção e limpeza do sistema de canais através da remoção dos tecidos pulparem inflamados ou necróticos. Podemos atingir o êxito no tratamento utilizando a modelagem do canal com um arsenal endodôntico adequado complementado e catalisado pela ação de substâncias químicas. Seria interessante a utilização de uma única substância química ideal que pudesse cumprir todas as funções desejadas. Na ausência desta substância ideal devemos fazer uso de algumas substâncias que se complementam para ter êxito na função da desinfecção e limpeza do canal. As funções que as substâncias químicas devem ter são: remoção ou degradação de tecidos orgânicos ou inorgânicos, irrigantes, lubrificantes, medicação intracanal, tendo como ação principal a atividade antimicrobiana.

A evolução dos instrumentos endodônticos nos dias atuais propicia ter no arsenal de instrumentos de trabalho limas de níquel-titânio (NiTi) melhor eficiência de corte, maior flexibilidade e resistência, visando permitir preparos mais seguros e uniformes, que, conjuntamente às substâncias químicas, possam otimizar a capacidade de sanificação ou desinfecção do canal radicular (Plotino et al., 2012).

Instrumentos com maior eficiência de corte, maior flexibilidade e resistência permitem preparos mais uniformes com menor risco de iatrogenias, mesmo assim ainda há a necessidade de trabalhar conjuntamente às substâncias químicas para que possam otimizar a capacidade de sanificação ou desinfecção do canal radicular.

Apesar dos debris e sujidade serem removidos de modo mais eficaz com os instrumentos rotatórios de NiTi, o smear layer (camada híbrida de restos de dentina e debris) ainda se mantém presente na maioria dos canais, possivelmente havendo a presença concomitante de bactérias viáveis.

A literatura já tem relatado a preocupação de que, sem uma desinfecção efetiva do canal radicular, certamente o tratamento endodôntico caminhará para o insucesso.

Desde Ingle e Zeldow (1958), ao estudarem o efeito da instrumentação em dentes comprovadamente infectados se utilizando como solução irrigadora água destilada estéril, observaram que apenas 27% das culturas se apresentaram negativas imediatamente após o preparo, sendo que em 20% das culturas era notada a reinfecção após 48 horas. Foi concluído que apenas a instrumentação não é suficiente para desinfetar os canais radiculares e que a água destilada não tinha ação bactericida, como também não era capaz de agir nos interstícios do canal, onde provavelmente estariam as bactérias. Logo a ação dos instrumentos isoladamente não é suficiente para se obter uma desinfecção do sistema de canais radiculares.

As substâncias químicas são imprescindíveis durante o preparo químico-cirúrgico e devem possuir as propriedades: de umectar as paredes dentinárias, possibilitando maior rapidez e uniformidade de limpeza; Lubrificar o canal, facilitando a ação dos instrumentos; aumentar a permeabilidade dentinária; emulsionar as partículas de detritos existentes nas paredes do canal radicular, tornando possível a remoção dos mesmos; ser solúvel em água; e essencialmente: ter biocompatibilidade, de modo a não lesar os tecidos vivos do coto pulpar e periodonto apical e ação antimicrobiana efetiva (Ingle; Zeldow, 1958, Grossman, 1964; Paiva; Antoniazzi, 1988; Cohen; Bruns, 2000; Estrela, 2004).

A substância que melhor preenche os requisitos de substância química a ser utilizada durante os procedimentos de modelagem e sanificação do canal continua sendo o NaOCl.

Grossman (1964) apresentou um método para irrigação dos canais radiculares com NaOCl a 5% associado ao peróxido de hidrogênio a 3%. Essa alternância produzia uma reação de efervescência, favorecendo a eliminação de restos orgânicos e dentina resultantes da instrumentação, deslocando-os para a câmara pulpar.

Contudo Paiva e Antoniazzi (1988) tentando diminuir o dano causado pelo forte poder de efervescência das substâncias, iniciaram o emprego de uma combinação de peróxido de uréia e detergente, veiculados numa base de Carbowax, gerando a fórmula do Endo-PTC® (associação de peróxido de carbamida 10%, Tween 80 a 15% veiculados em uma base de Carbowax 75%). Este reage com o NaOCl a 0,5% durante o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares, sendo uma substância bem mais tolerada pelos tecidos periapicais e ainda com a reação de efervescência entre o Endo-PTC® e o NaOCl a 0,5% eliminava restos de dentina, bactéria e outros produtos tóxicos, bem como produzia a liberação de oxigênio nascente.

Bombana et al. (1974), observaram a reação inflamatória em olho de coelho quando em contato por 10 minutos com a utilização de NaOCl a 0,5% reagindo com o Endo-PTC® e na técnica proposta por Grossman (1964), com soda clorada reagindo com água oxigenada – 20 volumes. Chegando à conclusão de que a resposta inflamatória observada no grupo NaOCl a 0,5% foi reversível e bem tolerada pelos tecidos vivos já no grupo com soda clorada apresentou respostas inflamatórias bem mais severas, denunciando a má tolerância dos tecidos conjuntivos aos fármacos empregados.

A variação da concentração e também do tempo de contato são capazes de modificar a ação antibacteriana do NaOCl.

Harrison et al. (1990) estudaram as propriedades antimicrobianas do NaOCl a 2,62% e 5,25% de 15 a 120 segundos sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Cones de papel absorvente esterilizados foram contaminados em suspensões microbianas. Após 45 segundos de exposição ao NaOCl a 5,25% e 60 segundos de exposição ao NaOCl a 2,62%, não houve o crescimento de *Enterococcus faecalis*. A *Candida albicans* foi eliminada após 15 segundos de exposição a ambas as soluções testadas.

Um estudo sobre a capacidade de limpeza de irrigantes e substâncias químicas durante a instrumentação endodôntica foi feito por Carvalho et al. em 2008. Através da análise em microscopia eletrônica de varredura foi feita análise de instrumentação radicular padronizada com diferentes irrigantes: 1- NaOCl a 2,5% + EDTA a 17%; 2- CHX gel a 2% + EDTA a 17%; 3 - Canal Plus + NaOCl a 2,5%; solução salina + EDTA a 17%. Após a instrumentação, os dentes foram observados em microscopia de varredura com magnificação de 2000x para avaliar a limpeza dos

terços cervicais, médios e apicais. A área analisada foi quantificada de acordo com a porcentagem de túbulos abertos e os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey ($p=0,05$). Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa com a maior quantidade de túbulos abertos nos grupos 1 e 3. Em todos os grupos, o terço cervical obteve limpeza melhor do que a obtida nos terços médios e apicais, com diferença estatisticamente significativa no grupo da CHX. A irrigação com Canal Plus® em combinação com NaOCl e NaOCl seguido de EDTA produziu uma melhor limpeza das paredes do canal radicular.

A capacidade de dissolução de tecido pulpar também é muito importante para uma substância irrigadora. Okino et al. em 2004 estudaram dissolução de tecido pulpar bovino frente à ação das soluções de NaOCl a 0,5; 1,0 e 2,5% e soluções aquosas de CHX a 2% e CHX gel a 2%, tendo por controle a água destilada. Os autores verificaram que a capacidade de dissolução é diretamente proporcional à concentração de NaOCl, enquanto que as duas formas de CHX avaliadas não mostraram qualquer ação solvente sobre o tecido.

2.2- Clorexidina

A clorexidina (CHX) é um composto sintético derivado de uma biguanida, na forma monomérica, que pelas suas características apresenta um alto nível de atividade, própria dos antimicrobianos de amplo espectro. Em função deste grau de atividade, pequenas concentrações de sais de CHX são geralmente suficientes para inibir o processo reprodutivo ou eliminar a maioria das espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas e fungos. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) situam-se bem abaixo de 4% o que faz da CHX um dos antissépticos de melhor rendimento e total segurança. A solução de CHX mais utilizada na odontologia é o digluconato de clorexidina (Brum, 2012)

O digluconato de CHX é um sal solúvel em água. O íon positivo desse sal é a CHX com massa molecular de 505,4460 g/mol. A solução comercialmente disponível para análises apresenta concentração de 20% do sal em água (digluconato de CHX a 20%, Sigma-Aldrich, WVK, Germany). A estrutura molecular da CHX pode ser vista na Figura 2.1.

Figura 2.1 - Estrutura molecular da Clorexidina (CHX)

A CHX possui na sua estrutura molecular que pode ser descrita como sendo um grupo hexileno (Figura 2.2), com dois grupos guanidil (Figura 2.3) nos carbonos da extremidade e um grupo clorofenil (Figura 2.4) ligado a cada grupo guanidil.

Figura 2.2 – Grupo hexileno

Figura 2.3 - Grupo biguanidil

Figura 2.4 - Grupo clorofenil reage com H que liga com a guanidina

Os compostos derivados de biguanidas tem como mecanismo de ação bactericida uma rápida adesão catiônica à membrana bacteriana, esta carregada negativamente atrai a molécula provocando uma falha no mecanismo de defesa culminando na ruptura da parede celular bacteriana. A Atração da biguanida à membrana causa perda de substâncias de baixo peso molecular como íons de

cálcio, potássio e a inibição de enzimas de manutenção da membrana como a ATPase. Esta ruptura leva à perda de macromoléculas como nucleotídeos e à precipitação de substâncias celulares em contato com o meio externo (Kim et al., 2012).

O digluconato de CHX tem sido demonstrado como possível substituto do NaOCl por apresentar menor toxicidades, ter ação antimicrobiana contra espécies resistentes ao NaOCl, menor tensão superficial e por apresentar ação residual após seu contato com a dentina, fenômeno conhecido como substantividade. Porém, o digluconato de CHX não tem a capacidade de degradar tecido orgânico, um importante requisito das substâncias químicas a serem usadas durante o preparo do canal. Dessa forma, procura-se empregar o digluconato de CHX como medicação intracanal ou como irrigante final com o objetivo de complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares (Brum, 2012).

Ferraz et al. em 2001, testaram o gel de CHX com sua ação antimicrobiana e a propriedade mecânica do gel de CHX como irrigante endodôntico *in vitro* e concluíram que possui alto potencial como irrigante endodôntico.

Em 2001 Lima et al. estudaram a eficácia e as alternativas de medicamentos intracanal para eliminar o biofilme de *Enterococcus faecalis*. Mesmo quando comparado com medicamentos antibióticos como clindamicina associada ao metronidazol a CHX 2% foi mais eficiente em eliminar a maioria das bactérias do biofilme dos *E. faecalis*.

Tanomaru Filho et al. (2002) avaliaram a resposta inflamatória de alguns irrigantes endodônticos injetados no interior da cavidade peritoneal de ratos. Os resultados mostraram que o NaOCl a 0,5% causou irritação tecidual e intensa resposta inflamatória, enquanto que a CHX a 2% mostrou ser biocompatível, podendo sugerir alternativa ou complemento ao hipoclorito durante a irrigação.

Jeansonne e White em 1994, mostraram o efeito antimicrobiano do gluconato de CHX a 2% e o NaOCl a 5,25%, como irrigantes endodônticos. Foram estudadas amostras microbiológicas que foram coletadas após a instrumentação de dentes humanos com polpas necrosadas. A irrigação com CHX ou NaOCl reduziu o número de colônias em comparação aos dentes irrigados com solução salina. Porém, não houve diferença estatística significativa entre a CHX e o NaOCl. Contudo, após 24 horas a eficácia da CHX foi de 83% e do hipoclorito foi 50%, mostrando maior substantividade da CHX.

Leonardo et al. (1999) estudaram *in vivo* o efeito antibacteriano do gluconato de CHX a 2% como irrigante endodôntico. Utilizaram dentes com polpa necrosada e lesão periapical vista radiograficamente. Compararam amostras microbiológicas dos dentes depois de abertos os canais, após preparo e CHX 2% e no retorno. O tratamento mostrou eficiência de 77,78% sobre microrganismos anaeróbicos depois da segunda sessão. Ficou demonstrado que a CHX evitou a atividade microbiana *in vivo* com efeito residual, no interior dos canais radiculares, após 48 horas.

Oliveira et al. (2007a), ao estudar a ação antimicrobiana do gel de CHX a 2% comparado a duas diferentes concentrações de NaOCl (1,5 e 5,25%) contra o *Enterococcus faecalis* concluíram que o de CHX a 2% e o NaOCl a 5,25% têm efetividades semelhantes contra o *Enterococcus faecalis* mesmo após 7 dias do preparo e quanto maior a concentração da solução de NaOCl, melhor sua ação antimicrobiana.

Em 1982, Ringel et al. estudaram *in vivo* o efeito do CHX 0,2% e do NaOCl 2,5% como irrigante endodôntico. Concluíram que o NaOCl a 2,5% como irrigante endodôntico foi mais eficaz que o gluconato de CHX a 0,2% como agente antibacteriano.

Outra qualidade da CHX é a de complementar no condicionamento da superfície do canal à adesão de novos materiais resinosos em dentes reabilitados endodonticamente.

Erdemir et al. (2004), avaliaram *in vitro* o efeito de vários medicamentos na resistência a microtensão da união material/dentina radicular tratadas com NaOCl a 5%, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% e a combinação de H₂O₂ e NaOCl ou CHX a 0,2% por 60 s; ou hidróxido de cálcio ou formocresol para 24 h. Os resultados indicaram que os tratamentos que utilizaram NaOCl, H₂O₂ ou uma combinação de NaOCl e H₂O₂ diminuiu a resistência de união à dentina radicular significativamente ($p < 0,05$). Os dentes tratados com solução de CHX mostraram os maiores valores de força de ligação ($p < 0,05$). Em conclusão, CHX é a solução irrigante adequado para o tratamento de canal radicular antes da aplicação de adesivos resinosos.

Santos et al., 2006, avaliaram a influência de irrigantes endodônticos na adesão à dentina da câmara pulpar de acordo com a solução irrigante usada: G1, NaOCl a 0,9% (controle); G2, NaOCl a 5,25%; G3, NaOCl a 5,25% + EDTA a 17%; G4, CHX a 2%; G5, solução CHX a 2% + EDTA a 17%; G6, CHX a 2% em uma base de gel; e G7, gel de CHX a 2% + EDTA a 17%. As médias das forças de adesão

foram analisadas e houve uma significativa diminuição na força de adesão associada a utilização do NaOCl, considerando que a irrigação com CHX não mostrou efeitos sobre a aderência. Concluiu-se que irrigantes endodônticos afetam diferentemente a resistência de adesão à dentina de câmara pulpar.

O objetivo do estudo de Ari et al. (2004) foi avaliar o efeito do gluconato de CHX a 0,2% comparado com as soluções irrigantes endodônticas mais utilizadas quanto a aspereza de superfície e microdureza da dentina radicular de acordo com a solução de irrigação utilizado sendo: Grupo 1: NaOCl a 5,25% por 15 min; Grupo 2: NaOCl a 2,5% por 15 min; Grupo 3: H₂O₂ a 3% por 15 min; Grupo 4: EDTA a 17% por 15 min; Grupo 5: gluconato de CHX a 0,2% por 15 min; e Grupo 6: (controle) água destilada. Os resultados indicaram que todas as soluções de irrigação, exceto a CHX, diminuiriam significativamente a microdureza da dentina radicular; H₂O₂ a 3% e CHX a 0,2% não apresentaram efeito sobre a aspereza da dentina radicular.

A microdureza e a aspereza de superfície da dentina radicular também foram testadas por Patil e Uppin (2011). Foram utilizadas soluções de NaOCl a 5% e a 2,5%, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, EDTA a 17%, gluconato de CHX a 0,2% e água destilada. Em seguida, os espécimes foram submetidos a testes de microdureza e rugosidade. Os dados foram analisados indicando que todas as soluções de irrigação, exceto gluconato de CHX a 0,2%, diminuiriam a microdureza da dentina radicular; e que o H₂O₂ e o gluconato de CHX a 0,2% não tiveram efeito na rugosidade da superfície.

Porém, Oliveira et al. (2007b), apresentam resultados diferentes quando da avaliação dos efeitos de irrigantes endodônticos sobre a microdureza da dentina radicular. Os espécimes foram aleatoriamente divididos em controle (solução salina); solução de gluconato de CHX a 2%; e NaOCl a 1%. Após 15 minutos de irrigação, foram realizados os ensaios de microdureza. Os espécimes irrigados com CHX a 2% e com NaOCl a 1% apresentaram valores inferiores de microdureza da dentina, com diferença significativa em relação ao grupo controle. Foi possível concluir que as soluções de CHX e NaOCl reduzem significativamente a microdureza da dentina radicular.

Com relação à capacidade como medicação intracanal constata-se o grande potencial antimicrobiano da CHX e a possibilidade de utilizá-la como componente auxiliar ao preparo já realizado.

Num clássico trabalho Delany et al. (1982), estudaram o efeito do gluconato de CHX como irrigante radicular em dentes recém-extraídos com polpa necrosada. Amostras bacteriológicas foram obtidas antes, durante, imediatamente depois e 24 horas; após instrumentação, irrigação e medicação intracanal; com CHX 0,2% em um grupo e solução salina estéril em outro. Houve alta redução de microrganismos nos dentes tratados com CHX depois da irrigação e instrumentação. Significante redução foi notada no interior do canal depois de 24 horas de ação da CHX. Os dentes tratados com solução salina demonstraram apenas uma pequena redução da flora após os procedimentos biomecânicos. Quando não medicados, notou-se um aumento de 80% de microrganismos nos dentes unirradiculares e 50% nos dentes multirradiculares, provavelmente pela existência de restos teciduais e substratos que contribuem para multiplicação bacteriana. Concluíram que o gluconato de CHX 0,2% pode ser um eficaz agente antimicrobiano quando usado como irrigante endodôntico, ou como medicação intracanal entre sessões para reduzir bactérias restantes no interior do canal radicular.

Já Haapasalo et al. (2000) foram investigar a inativação da atividade antibacteriana, pela dentina, de algumas medicações intracanal. As medicações testadas foram: a solução saturada de hidróxido de cálcio, NaOCl a 1%, acetato de CHX a 0,5% e 0,05% e iodeto de potássio iodado a 2/4% e 0,2/0,4%. O pó da dentina teve efeito inibitório em todas as medicações testadas. O efeito era dependente da concentração das medicações, assim como no tempo em que as medicações eram pré-incubadas com o pó da dentina antes de adicionar as bactérias. O efeito do hidróxido de cálcio no *E. faecalis* foi totalmente inibido pela presença do pó de dentina. O iodeto de potássio iodado a 0,2/0,4% também perdeu seu efeito após a pré-incubação por 1 hora com a dentina antes de adicionar as bactérias. O efeito da CHX a 0,05% e do NaOCl a 1% sobre *E. faecalis* foi reduzido mas não eliminado totalmente pela presença da dentina. O modelo do pó de dentina parece ser uma ferramenta eficiente para o estudo das interações entre medicações, a dentina e os microrganismos. Os autores discutem a dentina exerce efeito tampão na capacidade de elevação do pH, principal característica do hidróxido de cálcio como medicação intracanal.

Manzur et al. (2007) testaram a ação antibacteriana do hidróxido de cálcio em associação com a CHX, comparado a CHX e ao hidróxido de cálcio na forma de medicação intracanal por 7 dias. Analisando a microbiota em três diferentes tempos:

imediatamente antes do preparo, imediatamente depois do preparo e 7 dias após a utilização das medicações em uma segunda sessão. Os autores concluíram que houve redução bacteriana significativa promovida pelo preparo, porém não houve redução estatisticamente significativa entre o período de medicação para nenhuma das medicações intracanal, não havendo também diferença estatística entre elas.

Wang et al. (2007) avaliaram a eficiência clínica da CHX gel a 2% em combater as bactérias intracanal de pacientes com periodontite apical crônica. Foi possível concluir que a CHX gel a 2% é efetiva na desinfecção de canais radiculares. Os autores ainda discutem que, apesar da medicação intracanal não ter ação desinfetante adicional, ela permitiu a manutenção dos níveis de desinfecção alcançados por 14 dias, pois também não houve aumento estatístico na porcentagem de bactérias.

Gomes et al. (2001) avaliaram, *in vitro*, a capacidade antimicrobiana de diferentes concentrações do NaOCl (0,5; 1, 2,5; 4 e 5%) e do digluconato de CHX gel e líquido em 3 concentrações (0,2; 1 e 2%) contra o *Enterococcus faecalis*. Concluíram que o tempo necessário para a total eliminação do *E. faecalis* varia de acordo com a concentração e o tipo de irrigante. Os melhores resultados foram atribuídos a solução de CHX a 1 e 2% juntamente com o NaOCl a 5,25%.

Quanto à ação antifúngica, Sen et al. (1999) testaram o hipoclorito de sódio e a clorexidina nos canais radiculares com presença e remoção de smear layer e subsequente colonização com *Candida albicans*. Na presença de smear layer, a atividade antifúngica de todos os irrigantes só se iniciou após 60 minutos. Nos dentes sem smear layer a atividade antifúngica foi superior. Em 30 minutos o NaOCl 5,0% mostrou atividade antifúngica de 70%, e em 60 minutos foi totalmente eficaz. A CHX 0,2% e o NaOCl a 1,0% mostraram eficácia total em 60 minutos.

A Literatura ressalta os efeitos positivos da associação do NaOCl e a CHX: a substantividade, a boa ação antimicrobiana da CHX e o alto poder de dissolução tecidual do NaOCl, que também possui efetiva propriedade antimicrobiana.

Kuruvilla e Kamath (1998) avaliaram a capacidade antimicrobiana de quatro substâncias químicas separadas e combinadas: o NaOCl a 2,5%, a solução de gluconato de CHX a 0,2%, uma solução feita pela associação na proporção 1:1 das duas substâncias e como controle uma solução fisiológica a 0,9%. Houve redução do número dos microrganismos analisados de 59,4% para NaOCl, 70% para CHX, 84,6% para a combinação dos dois e 25% para o controle com relação à

desinfecção através da irrigação. Foi relatado o surgimento de uma substância com coloração marrom, quando da associação, que permanece na parte interna das raízes após a irrigação, mas que esta não é observada na porção externa das raízes.

Com relação ao precipitado acastanhado, White et al. (1999) afirmam que o produto acastanhado formado da associação das substâncias é facilmente removido com o auxílio de um instrumento endodôntico e mesmo que não seja removido, não compromete esteticamente a superfície externa da raiz do dente. Eles também preconiza o uso da CHX após a utilização do NaOCl durante a fase de preparo, como um irrigante final do canal.

Zehnder (2006) sugere uma irrigação final com CHX com o objetivo de complementar a desinfecção do NaOCl como substância durante os procedimentos de sanificação e modelagem do canal radicular. Contudo, alerta que deve haver uma irrigação intermediária com EDTA para a remoção dos resíduos do NaOCl para que não ocorra reação entre este e a CHX.

Há uma antagonização por parte de Siqueira Jr (1997) e outros autores ao discutir que NaOCl e CHX não devem ser utilizadas conjuntamente, porque ocorre uma reação química gerando pigmento vermelho ou castanho, que impregna a intimidade da dentina, dificultando sua remoção.

Kishen et al. (2008) estudaram a capacidade de diminuir a adesão do *E. faecalis* ao substrato de dentina. Mesmo após o preparo, se tais bactérias permanecerem no interior do canal, podem promover o início da formação do biofilme, possibilitando um futuro insucesso nos tratamentos endodônticos. Alguns regimes de irrigação podem diminuir esta adesão bacteriana à dentina. Os autores concluíram que, o regime de irrigação que mais diminui a capacidade de adesão do *E. faecalis* é NaOCl seguido de EDTA e posteriormente CHX. Porém, deve-se tomar cuidado quando se utiliza CHX e NaOCl juntos em regimes de irrigação devido a formação do precipitado castanho.

A CHX assim como o NaOCl apresentam instabilidade frente às mudanças de temperatura e Ph com possível degradação em subprodutos. Isto é crítico com relação a associação de substâncias, pois a reação entre elas pode levar a degradação de uma, ou ambas, e produzir subprodutos tóxicos aos tecidos periapicais ou que interfiram nos demais passos da terapia endodôntica como a fase

de medicação intracanal, quando a permeabilidade se torna importante, ou quando da obturação do sistema de canais (Brum, 2012).

Jaminet et al. (1970) sugeriram a degradação da CHX em paracloroanilina (PCA). Observaram que a hidrólise da CHX provoca redução mínima na atividade antimicrobiana da solução e os subprodutos gerados não afetam a sua conservação. Os autores citaram, ainda, que a CHX é incompatível com inúmeras substâncias, ressaltando aquelas com caráter aniônico.

O uso combinado de NaOCl e CHX com ácido cítrico(AC) e CHX sobre a permeabilidade dentinária e formação de precipitado foi estudado por Akisue et al. (2010). Compararam grupo controle positivo (PC), sem irrigação; AC a 15% + grupo CHX a 2% (AC + CHX); NaOCl a 1% + grupo CHX a 2% (NaOCl + CHX). Os autores concluíram que a combinação de NaOCl 1% e CHX a 2%, ambas em solução, resultam na formação de um precipitado que age como uma camada de smear layer químico, reduzindo a permeabilidade dentinária no terço apical.

Basrani et al. (2007) analisaram de forma qualitativa e quantitativa o produto da associação de NaOCl e do gluconato de CHX. Foram analisadas diferentes concentrações de NaOCl com CHX a 2% sob o ponto de vista de alteração cromática, formação de precipitado e características químicas do precipitado. Os resultados demonstraram que há reação das substâncias, mesmo nas mais baixas concentrações de NaOCl, havendo formação de precipitado em concentrações a partir de 0,19%. Também foi possível observar a presença de PCA com relação diretamente proporcional a concentração do NaOCl, o que sugere que o precipitado seja formado principalmente por este produto.

Do mesmo grupo de estudo, os pesquisadores Basrani et al. em 2010 analisaram a presença de 4-cloroanilina e seus isômeros, 2-cloroanilina e 3-cloroanilina, comparando novamente o precipitado a estas substâncias em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. Os resultados mostraram ausência de outros derivados de anilina no precipitado. Apenas 4-cloroanilina foi encontrado. Foi enfatizado, até que o precipitado seja melhor estudado parece prudente minimizar a sua formação, evitando o uso de CHX juntamente com NaOCl.

O estudo de Bui et al. (2008) avaliou em Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental (MEVA) o número de túbulos abertos e a quantidade de debris após o efeito da irrigação dos canais com a combinação de NaOCl e CHX. Os

resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais com relação à quantidade de debris. Porém, houve diferença estatística entre o número de túbulos abertos do grupo controle negativo e os demais grupos. Os autores concluíram que o precipitado formado entre a CHX e o NaOCl tende a obstruir a entrada dos túbulos dentinários e alertam para que cuidados sejam tomados com relação à associação, enquanto o precipitado não for exaustiva e corretamente estudado.

Marchesan et al. (2007) avaliaram a capacidade de formar o precipitado em diferentes concentrações de soluções de NaOCl (0,5; 2,5 e 5%) com concentrações de CHX (0,2 e 2%) e a capacidade de dissolver este precipitado de algumas substâncias. Quanto aos solventes, metanol e hexanol por serem solventes universais (“similar dissolve similar”) foram usados para substâncias polares e apolares, respectivamente. Como só o metanol dissolveu o precipitado e este não deve ser usado in vivo, o ácido acético puro foi testado com sucesso, pois também tem baixa polaridade. Além disso, o vinagre comum (ácido acético a 0,1 mol/L) também foi testado e dissolveu o precipitado, mas manteve a coloração marrom da solução.

Outra linha de raciocínio sobre procedimentos endodônticos preconiza ser mais prudente evitar a formação do precipitado de NaOCl com CHX do que dissolvê-lo depois de formado, uma vez que a reação pode ocorrer na intimidade da dentina obliterando os túbulos dentinários.

Com o objetivo de avaliar dentre outras coisas a não formação e composição química do precipitado formado entre o NaOCl e CHX, Krishnamurthy e Sudhakaran (2010), compararam irrigação com NaOCl 2,5%, seguida por EDTA 17%, seguida por CHX 2%, com grupos de irrigação intermediária antes do EDTA e CHX por: álcool absoluto, solução salina, e o água destilada. A interação entre o NaOCl e CHX resultou em um sal insolúvel neutro como um precipitado que pode ser evitado com o uso de álcool absoluto e minimizado usando solução salina ou água destilada como irrigantes intermediários.

Contudo, Brum em 2008 realizou semelhante estudo para avaliar os efeitos da utilização do NaOCl 1% pH 9.0 na irrigação durante o preparo seguido do gel de CHX a 2% como medicação intracanal. Testou-se irrigação intermediária antes da CHX com: ácido cítrico ou tiosulfato de sódio 10%+ ácido cítrico. Apenas quando o

NaOCl foi inativado pelo tiosulfato, pode-se observar quantidades desejáveis de túbulos visíveis e patentes.

Ferreira et al. (2008) avaliaram a capacidade de limpeza de diferentes substâncias químicas ativadas com ultrassom. Compararam (1) água destilada como controle; (2) CHX 0,2%; (3) NaOCl 2,5%; e um (4) filtrado obtido após a combinação de CHX 0,2% e NaOCl 2,5%. Os grupos 1 e 2 apresentaram a maior quantidade de detritos, enquanto que 3 e 4 foram mais eficientes na remoção de detritos. Foi concluído que não há nenhum benefício adicional na remoção de detritos das paredes do canal radicular quando da irrigação com o filtrado obtido da mistura de NaOCl e CHX quando comparado com o uso apenas de NaOCl, não justificando o uso da mistura para irrigação do canal radicular.

Barbin et al. (2008) determinou se PCA e/ou espécies reativas de oxigênio (ROS) são gerados por CHX sozinha ou após CHX ser misturada com hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , em 7 e 14 dias. PCA foi detectada na solução CHX 0,2% após 14 dias. A mistura de CHX com Ca(OH)_2 liberou ROS em todos os pontos de tempo, mas nenhum traço de CHX estava presente na mistura, resultado de uma degradação imediata do CHX.

Os resultados do estudo de Thomas e Sem (2010) também concordam com Barbin et al. (2008). Analisaram a presença de PCA na reação NaOCl com CHX e concluíram que a reação de NaOCl e CHX não produz PCA em quantidade mensurável e são necessárias novas investigações para determinar a composição química do precipitado castanho.

Nowicki e Sem (2011) estudaram a composição química do precipitado formado pela mistura 1:1 de NaOCl e CHX 2% e o peso molecular relativo dos componentes de seus subprodutos. Seus resultados foram inovadores na Literatura, pois, nenhum deles é a PCA. Ambos os produtos estão relacionados com PCA, uma vez que também são compostos parasubstitutos do anel benzênico, parecem ser paraclorofenil uréia (PCU) e paraclorofenilguanidil-1,6-diguanidil-hexano (PCGH). Os autores concluíram que o precipitado formado na reação do NaOCl e CHX é composto de, pelo menos, duas moléculas separadas, que são menores em tamanho que CHX. Junto com CHX não degradada, o precipitado contém dois fragmentos químicos derivados da degradação da CHX (PCU e PCGH) não havendo a presença de PCA.

Kim et al. (2012), analisaram em espectrometria de massa de ionização se a reação química entre a alexidina e o NaOCl resultaria na formação de um precipitado e de PCA. Ambas do grupo das biguanidas a alexidina se difere quimicamente da CHX, pois possui grupos etilhexilo na extremidade da molécula, no lugar do grupo clorofenil. Seus resultados sugerem que PCA não é formado na reação alexidina/NaOCl (figura 2.5). Também não é observada a formação de precipitado na superfície dos canal radiculares tratados com a associação. A coloração da reação varia de cor amarela claro para translúcida com a diminuição da concentração de alexidina. Os autores sugerem que se a ação antimicrobiana da associação, que precisa ser estudada, for maior que a dos compostos isolados, uma biguanida pode ser utilizada em associação com o NaOCl, sem trazer consequências ao tratamento endodôntico.

Figura 2.5 Estrutura molecular da alexidina, segundo Kim et al. (2012)

Rasimick et al. (2008), estudou se o precipitado formado entre CHX e EDTA envolve a degradação da CHX. Mais de 90% da massa do precipitado demonstraram ser EDTA ou CHX. O restante aparenta ser água, gluconato e sódio. PCA, um produto de decomposição potencialmente cancerígenas de CHX, não foi detectado no precipitado. A razão molar de CHX para EDTA no precipitado foi cerca de 1,6:1. Com base nos resultados, CHX forma um sal com EDTA, ao invés de sofrer uma reação química.

Camões et al. (2004) avaliaram pequenas quantidades de amostras líquidas nas quais pré-molares humanos foram imersos. Cada dente foi imerso em frascos de água deionizada ultra-pura destilada e lá permaneceram após o preenchimento dos seus canais com Ca(OH)_2 associado com veículos diferentes: Grupo 1: polietilenoglicol e colophon (Calen); Grupo 2: glicerina e paramonoclorofenol

canforado; Grupo 3: paramonoclorofenol canforado; Grupo 4: glicerina e tricresolformalina; e grupo 5: solução anestésica (Citanest). Foram realizadas análises em HPLC (high-performance liquid chromatography) para detectar outras substâncias que tinham difundido das pastas usada nos canais dos dentes que não fossem cálcio e íons hidroxila. Analisando os gráficos do HPLC, pode-se concluir que não só Ca^{2+} e OH^- , mas também uma quantidade considerável de outros componentes da pasta difunde através da dentina e atingiu a superfície externa da raiz, ou seja, componentes do tratamento endodôntico podem atingir o periápice através da dentina radicular dos dentes, além do que sofreu extrusão apical durante o tratamento.

Figura 2.6 – Mecanismo de degradação da CHX sugerido em condições ácidas, segundo Zong (2011)

Vários autores sugerem caminhos diferentes para a degradação da CHX quando em contato com outras substâncias. Mas foi Zong (2011) que discute que a CHX é degradada em PCA através de diversos mecanismos pH dependentes. Em condições ácidas, a formação do p-cloroanilina é direta sendo a principal via. Já em

meio alcalino, o principal mecanismo de formação da PCA é indireta, através da formação inicial da PCU (Figura 2.6 e 2.7).

Figura 2.7 – Mecanismo de degradação da CHX sugerido em condições alcalinas, segundo Zong (2011)

Os trabalhos na literatura descrevem mecanismo e compostos de degradação da CHX diferentes, em geral sinalizam para a existência de uma parte da molécula de CHX reativa, o grupo biguanidil, onde há possibilidade de ocorrer a quebra da molécula, levando ao seu alto grau de reatividade com outras substâncias e microorganismos. Ocorre devido ao nitrogênio mais externo, que apresenta ligação dupla com o carbono, ser carregado positivamente, sendo um receptor de elétrons. O centro estrutural da molécula apresenta radicais hidroxila (OH.). Segundo Brum (2012), é sugerido a hipótese de que a CHX, quando degradada pelo NaOCl, se fragmente nesses pontos e posteriormente se reagrupe através dos mesmo pontos produzindo novos compostos com pesos moleculares maiores que o da CHX, gerando estruturas moleculares poliméricas semelhantes às dos polihexametileno biguanida.

As substâncias químicas são parte imprescindível para o tratamento endodôntico durante suas diferentes etapas. Apesar de o NaOCl ser a substância mais utilizada na endodontia, sua ação pode e deve ser complementada através de associações de uso com outras substâncias. A CHX se apresenta como uma substância com potencial de complementar a ação do NaOCl. Porém, cuidados devem ser tomados quando se utiliza estas substâncias de forma associada (Brum, 2012).

2.3- Cultura celular

A cultura celular é o complexo processo pelo qual células são cultivadas sob condições controladas fora de seu ambiente natural e *in vitro* em uma instalação laboratorial.

A cultura celular se inicia pelo isolamento de células a partir de uma matriz biológica ainda ativa e com vida que pode ser um fragmento de osso através de uma cirurgia, gengiva ou até polpa dentária adulta de um 3º molar. A partir do momento em que foi selecionado o fragmento doador ou explante para cultura gera uma cultura primária da célula desejada para estudo.

Nesta cultura, utilizando meio de crescimento com fatores e dosagens específicas de cada célula é possível separar as células desejadas através de seu crescimento maior em detrimento de outros tipos celulares que crescerão pouco ou nada com relação à célula alvo. Então através de atividade enzimática, tripsinização e outros métodos é possível colher as células daquele explante e transferi-las e isolá-las. A partir daí se tem uma cultura primária da célula a ser estudada.

Neste estudo avaliamos a influência da mistura do Hipoclorito com a CHX em 2 tipos celulares: fibroblastos e células-tronco de polpa dentária.

Os fibroblastos são células que sintetizam matriz extracelular e colágeno. Formam o arcabouço estrutural (stroma) de todos os tecidos animais e desempenha papel fundamental na cicatrização e regeneração de feridas. São as células mais comuns do tecido conectivo animal e a 1ª célula a entrar em contato com agentes agressores do interior para o exterior do dente na região radicular a partir de sua parede dentinária e ápice na forma do ligamento periodontal. Utilizamos células fibroblásticas FMM-1 de gengiva oral humana.

As células-tronco são encontradas em todos os organismos multicelulares que possuem mitose e devido a isso podem se diferenciar em diversos tipos celulares especializados além de poderem se autorenovar para produzir mais células-tronco. Nos mamíferos há dois tipos básicos de células-tronco: embrionárias isoladas da massa interna de blastocistos; e adultas, que são encontradas em vários tecidos. Em organismos jovens estas células desempenham sua função de crescimento, diferenciação e formação de órgãos. Em organismos adultos as células-tronco e células progenitoras agem como um sistema de reparo para o

corpo, reabastecendo tecidos adultos. Utilizamos DPSCs (células-tronco, dental pulp stem cells, de polpa dentária pós natal) PDH-3 obtidas de cultura primária de polpa dentária humana a partir de dentes decíduos esfoliados.

Pode ser analisado em cultura de células o crescimento, sobrevivência e viabilidade celular através de um ensaio de MTT fornecendo um quadro de citotoxicidade de um agente ou substância. Também pode ser estudada a genotoxicidade através de um ensaio de micronúcleo.

2.4- Teste de Citotoxicidade através de redução do MTT

O ensaio ou teste de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, um anel tetrazólico amarelo) é um ensaio colorimétrico para medir a atividade de enzimas que reduzem o MTT amarelo para formazans precipitados corados como púrpura ou azul. A principal aplicação permite avaliar a viabilidade celular e sua proliferação. Também pode ser utilizado para determinar a citotoxicidade de agentes químicos utilizados na área da saúde ao analisar o estímulo ou inibição da viabilidade e crescimento celular. Quanto mais intensa a cor da reação, mais células viáveis que metabolizaram o MTT em suas mitocôndrias. A intensidade da coloração da reação é lida em um espectrofotômetro.

2.5- Teste de micronúcleos

O micronúcleo (Mn) é formado durante a transição da mitose na metáfase/anáfase da divisão celular. Pode originar de um cromossomo mais lento que ficou para trás gerando um evento aneugênico, que leva a perda de cromossomo, ou de um fragmento de cromossomo acêntrico que se destacou do cromossomo original gerando um evento clastogênico, no qual o fragmento não se integrará ao núcleo original.

O Mn é constituído por um pequeno aglomerado nuclear delimitado por membrana e separado do núcleo principal. Os micronúcleos são formados quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São

resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, ou seja, quebra ou perda de cromossomos. Agentes clastogênicos levam à quebra e fragmentação de cromossomos resultando em seções cromossômicas adicionadas, apagadas ou rearranjadas, já os agentes aneugênicos levam a um número anormal de cromossomos através da perda ou fusão destes.

O micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico. É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Consequentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (Fenech et al., 2011).

Figura 2.7 – Mitose com citocinese interrompida pela CtB. (a) fragmento e cromossomo não incluído pelo núcleo principal; (b) apenas fragmento não incluído.

A citocalasina B (CtB) é um inibidor de polimerização da proteína actina requerida para a formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas (citocinese). No teste do Micronúcleo in vitro, o uso da citocalasina B, conforme proposto por Fenech e Morley em 1985, leva ao bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram

por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e de proporção de células em divisão (figura 2.7).

A análise do Micronúcleo em células binucleadas, além de permitir a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir em sua cinética de divisão, permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas, considerando que seria necessário analisar o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos observados em células binucleadas (Fenech et al., 2011).

O teste do MN com CtB pode ser usado para o biomonitoramento genotóxico de populações, para avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e para estudos específicos como variação interindividual para radiosensibilidade e predição da radiosensibilidade de tumores. Embora o teste do Mn com bloqueio de citocinese tenha sido inicialmente desenvolvido para ser aplicado em cultura de linfócitos humanos (Fenech; Morley, 1985), após adaptações, vem sendo também empregado com outros tipos celulares e para a identificação de parâmetros que refletem instabilidade genômica. Assim, o MN CtB é hoje um ensaio bastante utilizado em estudos *in vivo* como o monitoramento genotóxico de populações, *in vitro* como avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e seus possíveis mecanismos de ação e *ex-vivo* como radiosensibilidade individual (Kehdy, 2011).

O mecanismo completo da citoclasina ainda não é entendido por completo. Já se sabe que sua molécula se liga às terminações dos microfilamentos dos microtúbulos dentro das células impedindo a citocinese (divisão do citoplasma), ou seja, a célula em mitose acaba mantendo os dois núcleos da divisão no interior de um mesmo citoplasma. A citoclasina ao se conectar aos filamentos de actina inibe seu prolongamento e com isso polimerização da actina podendo mudar a morfologia celular, inibir processos celulares como movimentação e divisão e até causar morte celular por apoptose.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos Gerais

- Estudar os possíveis efeitos deletérios de citotoxicidade e genotoxicidade da solução de digluconato de clorexidina a 2% (CHX) e os subprodutos da sua mistura com a solução de hipoclorito de sódio a 1% sobre células com diferentes níveis de diferenciação.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade celular após contato com diferentes diluições de clorexidina e dos subprodutos sólido e líquido resultantes da mistura da clorexidina com hipoclorito de sódio a 1%.
- Avaliar a formação de micronúcleos em células após contato com diferentes diluições de clorexidina e dos subprodutos líquido e sólido resultantes da mistura da clorexidina com hipoclorito de sódio a 1%.
- Comparar as respostas de células com diferentes níveis de diferenciação às substâncias testadas, testar se fibroblastos FMM1 mais diferenciados apresentam respostas diferentes às substâncias do que as células-tronco PDH3.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP (Parecer nº25/2009 – Anexo A), os experimentos foram realizados junto ao laboratório de Pesquisa Básica “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da FOUSP.

4.1 Cultura Celular

Para o estudo foram utilizadas 2 linhagens celulares distintas: células fibroblásticas FMM-1 e células-tronco de polpa dentária humana (hDPSCs) da linhagem PDH-3. As linhagens FMM-1 e PDH3 foram cedidas pelo banco de células do Laboratório de cultura Básica da FOUSP.

Para cada célula foi utilizado meio específico de cultura:

- Para FMM1 – meio DMEM Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone, Thermo Scientific, Logan, UT, EUA), 50mg/ml penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Invitrogen).
- Para PDH-3 meio DMEM F-12 *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM F-12, Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone, Thermo Scientific, Logan, UT, EUA), 1mM aminoácidos não essenciais (NEAA, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA), 1mM L-glutamina (Invitrogen), 50mg/ml penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Invitrogen).

As culturas foram mantidas em semi-confluência até serem utilizadas no experimento ou serem crio-preservadas, visando-se ter um estoque de células para trabalho. Para o congelamento, as células foram re-suspendidas em seu meio de cultura fresco específico para cada célula de suplementado com soro fetal bovino específico e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). As células congeladas foram armazenadas em freezer de nitrogênio líquido. Todas as células foram incubadas a 37°C em atmosfera de ar umidificado a 5% de CO₂ (Freshney, 2000).

Para os experimentos, alíquotas das células foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 1 minuto. Após a remoção do meio contendo DMSO, as células cresceram em meio de cultivo previamente descrito.

Figura 4.1 – A) capela de fluxo laminar; B) Estufa de cultura de células 37°C e 5% CO₂; C) pipetas simples e multicanal; D) Leitor espectrofotômetro; E) Placa de MTT com 96 poços; F) Desenho da placa para o experimento.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados sob capela de fluxo laminar (figura 4.1, A e B), seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010). Vale ressaltar que o crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertido e que o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

4.2 Diluições da substâncias e Condicionamento de meio

Foram feitas diluições, em meio de cultura adequado a cada um dos tipos celulares, da solução de digluconato de CHX a 2% em quatro concentrações finais: 2% 0,02% 0,01% e 0,002% (tabela 4.1). Estas concentrações são referentes às diluições de concentrações de 100%, 1%, 0,5% e 0,25%.

Foi executada a mistura de partes iguais de CHX 2% e hipoclorito de sódio a 1%. O resultado da mistura são 2 subprodutos: um líquido (Liq) e um sólido (Sol). As fases foram separadas através de 15 minutos de centrifugação e removidas uma de cada vez.

Foram feitas diluições da fase líquida (Liq) da mistura com meio de cultura. A fase líquida foi diluída nas mesmas diluições de concentrações da CHX.

Figura 4.2 – A) Após 15 minutos de centrifugação da mistura em partes iguais de CHX 2% com NaOCl 1% (Liq – fase líquida da mistura, Sol – fase sólida precipitado; B) Meio de cultura condicionado por 24 horas pelo precipitado de A.

Para a fase sólida (Figura 4.2) teve que ser feito condicionamento de meio através da colocação do Sol em meio de cultura na concentração de 0,5 g/ml (ASTM F813-01 Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices). O meio com a parte sólida foi incubado a 37°C em atmosfera de ar umidificado a 5% de CO₂ por 24 horas. Então foi removido todo o meio

condicionado e reservado para os testes. Foram feitas diluições do meio condicionado pela fase sólida (Sol) da mistura.

As concentrações de diluições do Liq e Sol foram de 100% (fase líquida sem diluição e meio condicionado pelo sólido sem diluição); 1%; 0,5% e 0,25%.

4.3 Grupos Experimentais

	Concentração de Diluição das Substâncias			
	100%	1%	0,50%	0,25%
CHX 2%	(solução estoque sem diluição) - 1	2	3	4
Liq	(Fase líquida sem diluição) - 5	6	7	8
Sol	(meio condicionado sem diluição) - 9	10	11	12

Tabela 4.1 - Grupos experimentais das células FMM-1 e PDH-3 para o teste de viabilidade celular.

Para cada tipo de célula (Fmm1 e PDH3) os grupos foram: um grupo controle sem substâncias, apenas meio fresco; grupo CHX(100%, 1%, 0,5% e 0,25%); Liq (100%, 1%, 0,5% e 0,25%) e Sol (100%, 1%, 0,5% e 0,25%) (tabela 4.1).

4.4 Ensaio de proliferação em culturas de células

Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado para o meio teste com diluição ou condicionamento. Este meio teste ficou 15 minutos em contato com as células, então foi removido e foi feita uma lavagem com PBS e colocado meio fresco. As células aguardam mais 24 horas para se fazer a reação e leitura do MTT.

Os padrões de proliferação foram analisados utilizando os resultados da análise da atividade mitocondrial das células submetidas ao teste de redução do MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm (figura 4.1, C D e E).

Para a análise do crescimento celular através do teste de redução do MTT, as células foram cultivadas em condições normais de nutrição e as culturas foram plaqueadas (10^3 células por poço) em placas de cultivo de 96 poços. Foi realizado o teste MTT com 6 poços para cada concentração para cada substância para cada tipo celular em quadruplicata. Totalizando $n=24$ poços/ concentração/ substância/ tipo celular. Os dados de absorbância servirão para a obtenção das curvas de crescimento para as células cultivadas em condições normais de nutrição.

4.5 Análise estatística do teste de MTT

Os dados de absorbância foram comparados com teste Anova e post hoc Tukey de acordo com a distribuição normal da amostra. Os dois critérios do teste Anova para a viabilidade celular foram droga e concentração. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.6 Análise de Genotoxicidade por teste de Micronúcleo em cultura de células

Para análise de micronúcleo em cultura de células foram contadas mil células para cada grupo experimental e o número de micronúcleos encontrado foi apresentado em relação ao número de micronúcleos por mil células (MN/1000). Foram feitas duas contagens por cada concentração de substância testada.

As células foram cultivadas sobre lamínulas de microscopia ótica. Sendo que foram plaqueadas 6×10^3 células por lamínula. O experimento foi realizado com fibroblastos FMM1 devido a ser a célula mais diferenciada e com menor viabilidade

no teste do MTT. Após 24 horas do plaqueamento as células foram submetidas as drogas dos grupos experimentais que permaneceram em contato por 15 minutos com as células. Foi executado um enxágue com 2 ml de PBS antes e após o contato com as drogas testadas. Então, foi colocado meio de cultura fresco por mais 24 horas. Então é feita preparação através de fixação por 2 horas em glutaraldeído (Sigma, USA) em tampão fosfato de sódio, seguido de desidratação em bateria crescente de álcool (70% ao 100%) das lamínulas e coloração por 15 minutos com Hoechst (Sigma, USA) para marcação de micronúcleos. O filtro de leitura para o corante é o DAPI.

Foi utilizado o programa ImageJ para a contagem. Para cada lamínula de cada concentração, em aumentos de 100X no microscópio foram feitas fotos de alta resolução (+ de 1080 pixels). Foi colocada uma grade digital de 6 divisões e contadas cada divisão duas vezes.

4.7 Análise estatística do Teste de Micronúcleo

Os números de micronúcleos encontrados/1000 células foram comparados com teste qui-quadrado de acordo com a distribuição da amostra. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de proliferação em culturas de células

Foram realizados os testes de viabilidade celular com as duas linhagens. Os resultados da linhagem FMM-1(fibroblastos) estão apresentados nos gráficos 5.1 - 5.2 - 5.3., enquanto que os da linhagens PDH3(tronco) estão apresentados nos gráficos 5.4 – 5.5 – 5.6. As análises estatísticas estão no Apêndice A, tabelas 1, 2 e 3.

FMM-1

A análise estatística dos dados obtidos com esta linhagem de células mostrou diferenças na viabilidade celular em função tanto das substância quanto das concentrações de cada substância. No grafico 5.1 estão ilustrados os resultados de viabilidade celular em função das substâncias experimentais nas suas diferentes diluições.

Grafico 5.1- Viabilidade celular (%) em função de cada substância experimental nas suas diferentes diluições.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as diferentes diluições da mesma substância.

Para CHX foi observado que as concentrações de 01 e 100% levaram a uma viabilidade celular similar e significativamente menor que as obtidas em culturas tratadas com 0.5 e 0.25%. Somente na concentração de 0.25% houve viabilidade celular maior que a dose letal mínima, ou seja , 50%.

O liq e Sol levaram a viabilidade celulares diferentes entre todas as diluições estudadas. Para as duas substâncias, culturas tratadas com diluições de 0.5 e 0.25 apresentaram viabilidades celulares maiores que a concentração inibitória mínima.

No Gráfico 5.2 estão ilustrados os resultados de viabilidade celular em função das diluições das substâncias experimentais. Na diluição de 0.25% todas as substancias testadas apresentaram 100% de viabilidade celular. Quando aplicadas na diluição de 0.5% observou-se uma viabilidade celular no grupo CHX significativamente menor que aquelas observadas nos grupos Liq e Sol. Mas ainda nesta diluição a viabilidade do grupo liq. foi significativamente maior que do grupo tratado pelo meio condicionado pelo Sol.

Grafico 5.2- Viabilidade celular (%) em função das diferentes substâncias experimentais numa mesma diluição.

Letras diferentes indicam diferenças significantes entre as diferentes substâncias numa mesma diluição.

Na diluição de 1% as viabilidades celulares foram diferentes entre os três grupos sendo que a da CHX foi menor que a do Liq e esta menor que a do Sol. Para os grupos tratados com as substâncias não diluídas não houve diferença

significativa e as viabilidades celulares em resposta a esta concentração das drogas foram menores do que 4%.

No Grafico 5.3 os resultados de viabilidade celular em função das diluições das substâncias experimentais estão representados na forma de curvas e pode se observar que na curva CHX o DL50 corresponde a uma concentração entre 0.25 e 0.5%, enquanto que as curvas dos demais grupos mostram DL50 entre 0.5% e 1%. Mais ainda a amplitude de diluições que levaram a viabilidade celulares maiores que DL50 foi menor para CHX do que para as demais substâncias.

Este grafico de curvas mostra que para todos os grupos a viabilidade celular é inversamente proporcional às concentrações das substâncias.

Grafico 5.3- Curvas de viabilidade celular em função das diluições das substâncias experimentais

Viabilidades celulares acima de 50% são observadas nos grupos liquido e sólido numa maior amplitude de diluições do que no grupo da clorexidine, ou seja, a CLX levou mais de 50% das células a morte em concentrações menores que as dos demais grupos

PDH-3

A análise estatística dos dados obtidos com esta linhagem de células mostrou diferenças na viabilidade celular em função tanto das substâncias quanto das concentrações de cada substância. No grafico 5.4 estão ilustrados os resultados em função das substâncias experimentais nas suas diferentes diluições. Para CHX foi observado que as concentrações de 0,1% e 100% levaram a uma viabilidade celular

similar e significativamente menor que as obtidas em culturas tratadas com 0.5% e 0.25%. Nestas concentrações a viabilidade celular foi superior a 50%.

O liq e Sol levaram a viabilidade celulares diferentes entre todas as diluições estudadas. Para as duas substâncias, culturas tratadas com diluições de 0.5% e 0.25% apresentaram viabilidades celulares maiores que a concentração inibitória mínima.

Grafico 5.4- Viabilidade celular (%) em função de cada substância experimental nas suas diferentes diluições.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as diferentes diluições da mesma substância.

No Gráfico 5.5 estão ilustrados os resultados de viabilidade celular em função das diluições das substâncias experimentais. Na diluição de 0.25% todas as substâncias testadas apresentaram viabilidades celulares similares em cerca de 100%. Quando aplicadas na diluição de 0.5% observou-se uma viabilidade celular no grupo CHX significativamente menor que aquelas observadas nos grupos Liq e Sol. Mais ainda nesta diluição a viabilidade do grupo liq foi significativamente menor que do grupo tratado pelo meio condicionado pelo Sol. Todas as substâncias na diluição de 0.5% levaram a viabilidades celulares superiores a DL50. Na diluição de 1% as viabilidades celulares foram diferentes entre os três grupos sendo que a da CHX foi menor que a do Sol e esta menor que a do Liq. Para os grupos tratados com as substâncias não diluídas não houve diferença significativa e as viabilidades celulares em resposta a esta concentração das drogas foram menores do que 9%.

Grafico 5.5- Viabilidade celular (%) em função das diferentes substâncias experimentais numa mesma diluição.

Letras diferentes indicam diferenças significantes entre as diferentes substâncias numa mesma diluição.

Grafico 5.6- Curvas de viabilidade celular em função das diluições das substâncias experimentais

Viabilidades celulares acima de 50% são observadas nos grupos liquido e sólido numa maior amplitude de diluições do que no grupo da clorexidine, ou seja, a CHX levou mais de 50% das células à morte em concentrações menores que as dos demais grupos.

No Grafico 5.6 os resultados de viabilidade celular em função das diluições das substâncias experimentais estão representados na forma de curvas e pode se

observar que na curva CHX o DL50 corresponde a uma concentração de 0.5%, enquanto que as curvas dos demais grupos mostram DL50 entre 0.5% e 1%. Mais ainda a amplitude de diluições que levaram a viabilidade celulares maiores que DL50 foi menor para CHX do que para as demais substâncias.

Este gráfico de curvas mostra que para todos os grupos a viabilidade celular é inversamente proporcional às concentrações das substâncias.

PDH-3 vs. FMM-1

Com o objetivo de comparar as respostas de células em diferentes níveis de diferenciação às substâncias experimentais foram comparados estatisticamente os dados obtidos com as substâncias na diluição de 0,5%. Observou-se que para as três substâncias experimentais as viabilidades de células FMM-1 foram significativamente diferentes do que as das células PDH-3 (Gráfico 5.7). Nos grupos Liq e Sol para ambas linhagens as viabilidades celulares médias ficaram acima do DL50. No grupo da CHX as células PDH-3 apresentaram viabilidade celular média superior a IC-50 e as FMM-1 apresentaram a viabilidade celular média próxima a 30%.

Gráfico 5.7- Viabilidade celular das duas linhagens (FMM1 e PDH3) em função das substâncias experimentais na diluição de 0,5%

* Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as duas linhagens para a mesma substância

5.2 Análise de Genotoxicidade por teste de Micronúcleo em cultura de células

No teste Qui-quadrado foi verificado que não houve um desvio da distribuição dos dados observados em comparação com os valores esperados referentes ao grupo controle. Na tabela 5.1 são mostrados os dados da contagem de micronúcleos para cada grupo nas células FMM-1.

			FMM1							
Table 4.7 Frequências de micronúcleos nas células expostas às substâncias testadas										
Grupos e diluições		Número de células analisadas			Nº	Micronúcleos encontrados		%		
controle negativo		1000			2			0,2		
CHX 0,5%		1000			3			0,3		
CHX 0,25%		1000			2			0,2		
Liq. 0,5%		1000			1			0,1		
Liq. 0,25%		1000			2			0,2		
Sol. 0,5%		1000			1			0,1		
Sol. 0,25%		1000			2			0,2		

Tabela 5.1 – Resultados do Teste de micronúcleo nas células FMM-1.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram enfatizados os recentes avanços nas substâncias químicas utilizadas no tratamento endodôntico e teve a intenção de melhorar o entendimento do potencial citotóxico e genotóxico de irrigantes endodônticos utilizados na clínica como CHX e seus subprodutos gerados a partir de sua mistura com NaOCl visando aprimorar o conhecimento a respeito destas substâncias.

Os efeitos citotóxicos de substâncias químicas dependem de vários fatores, incluindo concentração, tempo e duração da exposição. Altas concentrações citotóxicas destas substâncias também podem evitar a deposição de matriz mineralizada para o fechamento do forame apical. Neste contexto, os resultados deste trabalho representam apenas em parte a extensão e complexidade das respostas celular e tecidual que ocorrem *in vivo*.

A sanificação do sistema de canais através da eliminação de microrganismos requer o uso da alternância ou combinação de soluções de irrigação para aprimorar a ação antimicrobiana, porém, a combinação de irrigantes pode levar a interações que podem ser prejudiciais para o resultado da terapia endodôntica.

A desinfecção per se depende da limpeza das paredes internas dos canais principais, pois só com essas paredes desobstruídas, a substância desinfetante poderá atingir o interior da dentina através da rede de canais radiculares secundários e dos túbulos dentinários. O NaOCl, que age com bastante eficiência em tecido orgânico, apresenta uma maior eficiência no uso de uma substância complementar que possa promover a remoção da matéria inorgânica. Neste caso, substâncias com a capacidade de remover tecido inorgânico como o ácido cítrico ou o EDTA são necessárias para que a sanificação seja completa (Okino et al., 2004; Siqueira, 1997; Brum, 2008; Akisue et al., 2010).

Em casos onde endotoxinas ou mesmo microrganismos resistentes a todos os procedimentos tradicionais permaneçam nos canais há a necessidade de uma substância alternativa. Esta seria o uso de mais uma medicação intracanal, principalmente o hidróxido de cálcio (CaOH) que é mundialmente considerado a medicação intracanal de escolha da endodontia. Sua ação dependente da elevação do pH com o tempo torna-se primordial para que todo o meio do sistema de canais se torne básico o suficiente para promover ou manter a desinfecção alcançada

durante as fases anteriores (Haapasalo et al., 2000; Erdemir et al., 2004; Ballal et al., 2011; Manzur et al., 2007; Wang et al., 2007; Barbin et al., 2008).

Como medicação intracanal alternativa ou associada como veículo ao CaOH tem sido muito estudada a CHX complementando o NaOCl o hidróxido de cálcio (Ferraz et al., 2001; Lima et al., 2001; Tanomaru Filho et al., 2002).

A CHX tem apresentado uma propriedades até então pouco conhecida e utilizadas na endodontia: a sua ação residual, ou substantividade. Essa propriedade permite que a substância permaneça agindo no interior do canal complementando ou mantendo níveis de desinfecção após o preparo do canal (Ingle e Zeldow, 1958; Jeansonne e White, 1994; White et al., 1997; Leonardo et al., 1999; Oliveira, D et al., 2007; Wang et al., 2007).

Contudo, uso da CHX é limitado por não apresentar capacidade de degradar tecido orgânico, importante papel de um irrigante endodôntico ideal, não substituindo as propriedades do NaOCl (Paiva e Antoniazzi, 1988; Cohen e Burns, 2000; Estrela, 2004; Okino et al., 2004; Siqueira, 2004).

A molécula de CHX é diferente, pois, exibe tanto propriedades anti-oxidantes quanto pró-oxidantes em diferentes condições experimentais, possivelmente devido a diferentes radicais estruturais. Isto explica em parte porque a CHX age como eficiente enxaguante bucal no controle da placa periodontal, como irrigante e como medicação para desinfecção em endodontia. Entretanto, concentrações maiores de 0.02% de CHX podem gerar quebras e mudanças de conformação de DNA (Yeung et al., 2007).

Há um consenso entre vários que propõem um regime de irrigação onde NaOCl e CLX são utilizados associados de diferentes formas, com a grande discussão ser o fato destas substâncias reagirem formando um precipitado de cor marrom, não solúvel em água (Siqueira Jr, 1997; Kuruvilla e Kamath, 1998; White et al., 1999; Zenhder, 2006; Basrani et al., 2007; Marchesan et al., 2007; Bui et al., 2008; Ferreira et al., 2008; Kishen et al., 2008; Akisue et al., 2010; Basrani et al., 2010; Krishnamurthy e Sudhakaran, 2010; Thomas e Sem, 2010; Nowicki e Sem, 2011).

A CHX é apresentada muitas vezes como uma substância com diversas vantagens como substância química a ser usada durante a terapia endodôntica, seja durante a modelagem, como irrigante final ou como medicação intracanal, mas há

um alerta sobre sua degradação gerar como principal subproduto a 4-cloroanilina (PCA).

Na Literatura, há uma preocupação com o PCA e outros subprodutos da degradação da CHX (Chhabra et al. 1991). O PCA foi considerado carcinogênico para ratos e camundongos machos ao induzir a formação de sarcomas e hemangiosarcomas no baço e fígado. Esta preocupação se faz presente uma vez que a PCA é tóxica, além de existir suspeitas de carcinogenicidade e mutagenicidade (Chhabra et al., 1990). Esta suspeita decorre da possibilidade de conversão de amins, como a PCA, em compostos do tipo N-nitroso quando da presença de hemoglobina (Golly e Hlavica, 1983). Evidências de estudos toxicológicos indicam a toxicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade da PCA (Kacmar et al., 1995). O Programa Nacional de Toxicologia da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos classificou a PCA como mutagênica e como provável carcinógeno humano.

Neste trabalho comparamos a solução de estoque de CHX a 2% em relação aos dois subprodutos da mistura do NaOCl 1% com CHX 2%, sua fase líquida (Liq) e sua fase sólida (Sol), frente aos resultados apresentados em testes de citotoxicidade e genotoxicidade.

Estudos anteriores feitos em peritônio de animais tentam analisar a toxicidade das substâncias químicas endodônticas. Tanomaru et al. 2002 e Gomes et al. 2001 ambos defendem que CHX apresenta baixo grau de toxicidade com grande tolerância pelos tecidos, sendo chamada de biocompatível não induzindo resposta inflamatória significativa. Nossos resultados discordam destes relatos no que se refere ao nível celular, indicando que o DL50 da CHX foi apenas através de diluições maiores que 100% e apenas 15 minutos de contato.

Nossos resultados de viabilidade celular sugerem que dentro dos parâmetros utilizados no experimento a CHX é mais citotóxica que seus subprodutos. Quando utilizada em pacientes tanto como substância irrigadora quanto medicação intracanal a CHX e seus subprodutos remanescentes no elemento dental dentro do sistema de canais radiculares deve sofrer diluições semelhantes ou maiores às utilizadas no nosso experimento. Estas diluições são feitas dinamicamente no meio interno fisiológico e devem gerar os mesmos efeitos observados em nossos experimentos com uma menor resistência às substâncias por parte dos fibroblastos e uma melhor resposta das possíveis células-tronco presentes no periápice.

O padrão celular de maior resistência por células menos diferenciadas como as PDH-3 repete o que é observado nos tratamentos de tumores, onde as células do tecido ao redor são mais diferenciadas e sofrem mais efeito das drogas contra os tumores, que apresentam células menos diferenciadas e mais resistentes.

Resultados com teste de cometa para genotoxicidade em células de linfoma de camundongo e fibroblastos humanos com formocresol, paramonoclorofenol e hidróxido de cálcio demonstraram que estas substâncias, que são supostamente genotóxicas em outras situações, não causam dano de DNA para os parâmetros de tail moment e tail intensity (Ribeiro et al. em 2005). Estas descobertas sugerem que estas substâncias não promovem dano ao DNA em células de mamíferos, e com isso outras substâncias utilizadas em endodontia também não apresentem dano ao DNA.

Em outro teste de genotoxicidade através do teste de cometa e do teste de micronúcleo (Ribeiro et al. em 2004) relatou que a CHX é capaz de induzir dano primário de DNA em leucócitos em células da mucosa oral, mas não produz quebra ou perda de cromossomo com aumento da formação de micronúcleos em eritrócitos do sangue. Similar aos nossos resultados no teste de micronúcleo que não identificaram aumento de MN para as substâncias estudadas.

A linhagem celular FMM-1 foi a escolhida devido ao fato de ter obtido um resultado desfavorável nos teste de viabilidade celular quando comparada a PDH-3 sendo assim mais sensível as substâncias testadas. Uma das hipóteses para não ter sido aumentado o número de MN pode se dever ao fato de que a CHX assim como seus subprodutos apresenta um mecanismo de ação na membrana citoplasmática que leva à morte celular ou apoptose posterior. Nos teste executados não foram marcadas células mortas ou em apoptose, necessitando outro teste para averiguar estas diferenças.

Nowicki e Sem (2011) sugerem apenas a formação de dois compostos no precipitado, a PCU e a PGCH, uma molécula complementar da outra quando da degradação da CHX. Deixando de confirmar a existência de PCA nas condições de mistura propostas pelo trabalho.

Espectros moleculares apresentados em outros trabalhos demonstram uma quantidade maior de compostos presentes no precipitado. (Basrani et al., 2007; Basrani et al., 2010; Brum, 2012). Nos mesmos espectros é possível observar que a maior parte dos compostos presentes no precipitado apresentam pesos moleculares

maiores que o da CHX. É sugerido que partes da molécula inteira ou fragmentada de CHX forme ligações com sítios específicos de outra molécula de CHX, ocorrendo um reagrupamento como um novo composto estável e insolúvel em água.

Portanto, através dos testes de viabilidade celular e micronúcleos foram observados uma maior resistência da linhagem de células menos diferenciada, uma diminuição da citotoxicidade da CHX pelo NaOCl, possivelmente pela degradação da parcela da molécula mais ativa, e a não formação de maior número de MN, talvez devido ao mecanismo de ação da CHX que leva à apoptose celular de células com micronúcleos.

Na Literatura, até o presente momento, não são conclusivos os efeitos do precipitado junto ao dente, tecidos de suporte e contra microrganismos sendo prudente evitar a associação de NaOCl e CHX.

Apesar da citotoxicidade e genotoxicidade da CHX e seus possíveis mecanismos terem sido estudados, resta muito a ser pesquisado. Há uma necessidade de estudos in vivo para estas substâncias para se ter certeza do índice de carcinogenicidade a médio e longo prazo. Além disso, o papel destes agentes com relação a interferências nos caminhos dos sinais celulares, padrões de expressão de genes e mecanismos epigenéticos, é fundamental para elucidar interações com o maquinário celular. Portanto, esta é uma área que merece investigação devido ao risco destas substâncias envolvendo citotoxicidade e genotoxicidade.

7 CONCLUSÕES

A viabilidade celular é inversamente proporcional à concentração das substâncias testadas.

Nas diluições acima de 1% todas as substâncias foram citotóxicas. A solução de dicluconato de clorexidina 2% mostrou-se menos tóxica em cultura celular apenas em concentrações menores do que seus subprodutos líquido e sólido resultantes da mistura da solução de dicluconato de clorexidina com hipoclorito de sódio a 1%. A toxicidade foi menor em seus subprodutos.

Não houve aumento na formação de micronúcelos em cultura celular de fibroblastos FMM1 em contato com solução de dicluconato de clorexidina 2% ou dos subprodutos líquido e sólido resultantes da mistura da solução de dicluconato de clorexidina com hipoclorito de sódio a 1%. Células menos diferenciadas são mais resistentes à ação da clorexidina.

Células em diferentes níveis de diferenciação respondem diferentemente à solução de dicluconato de clorexidina 2% e aos subprodutos líquido e sólido resultantes da mistura da solução de dicluconato de clorexidina com hipoclorito de sódio a 1%. Células menos diferenciadas são mais resistentes à ação da clorexidina.

Estudos *in vivo* se fazem necessários para saber a aplicabilidade destes resultados em monocamada da cultura de células em relação à densidade dos tecidos periapicais.

REFERÊNCIAS¹

Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. J Endod. 2010 May;36(5):847-50. Epub 2010 Feb 6.

Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. J Endod. 2004 Nov;30(11):792-5.

Ballal NV, Moorkoth S, Mala K, Bhat KS, Hussen SS, Pathak S. Evaluation of chemical interactions of maleic acid with sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. J Endod. 2011 Oct;37(10):1402-5. Epub 2011 Aug 6.

Barbin LE, Saquy PC, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pécora JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. J Endod. 2008 Dec; 34 (12):1508-14 Epub 2008 Oct 11.

Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. J Endod. 2010 Feb;36(2):312-4.

Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. J Endod 2007 Aug;33(8):966-9.

Bombana AC, de Paiva JG, Alvares S, Antoniazzi JH. Reação inflamatória do olho de coelho que se segue à instilação de alguns fármacos de uso endodôntico. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1974 Jul-Ago;28(4):216-23.

Brum TCB. Análise química do precipitado formado na reação entre hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia; 2012.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Brum TCB. Avaliação da reação do hipoclorito de sódio e do gel de clorexidina na superfície do canal radicular [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia; 2008.

Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. J Endod 2008 Feb;34(2):181-5.

Caldeira, CL. Manual de trauma, protocolo de atendimento. Disponível em: www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manualtrauma.pdf. Acesso em: 15 Jul 2012.

Camões IC, Salles MR, Chevitarese O, Gomes LN. Diffusion of Ca(OH)₂ associated with different vehicles: chromatographic study (high-performance liquid chromatography). J Endod. 2004 Jan;30(1):30-4.

Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. J Endod. 2008 Nov;34(11):1396-400. Epub 2008 Sep 17.

Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. Food Chem. Toxicol. 1991;29(2):119-24.

Chhabra RS, Thompson M, Elwell MR, Gerken DK. Toxicity of p-chloroaniline in rats and mice. Food Chem Toxicol 1990 Oct;28(10):717-22.

Cohen S, Burns RC. Caminhos da polpa. 7a ed. Jorge Lima Moreira, tradutor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982 May;53(5):518-23.

Erdemir A, Ari H, Güngüneş H, Belli S. Effect of medications for root canal treatment on bonding to root canal dentin. J Endod. 2004 Feb;30(2):113-6.

Estrela C. Ciência endodôntica. São Paulo: Artes Médicas; 2004.

Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, Bolognesi C, Knasmueller S, Kirsch-Volders M, Bonassi S. The HUMN and HUMN_xL international

collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis*. 2011 Jan;26(1):239-45. Review.

Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes *Mutat Res*. 1985 Feb-Apr;147(1-2):29-36.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001 Jul;27(7):452-5.

Ferreira RB, Marchesan MA, Silva-Sousa YT, Sousa-Neto M. Effectiveness of root canal debris removal using passive ultrasound irrigation with chlorhexidine digluconate or sodium hypochlorite individually or in combination as irrigants. *J Contemp Dent Pract*. 2008 Jul 1;9(5):68-75.

Freshney RI. *Biology of the cultured cell. Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4^{ed}. New York: Willey, 2000.

Golly I, Hlavica P. The role of hemoglobin in the N-oxidation of 4-chloroaniline. *Biochim Biophys. Acta*, 1983; 760(1): 69-76.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001 Sep;34(6):424-8.

Grossman LI. *Tratamento dos canais radiculares*. Trad. por Sylvio Bevilacqua. Rio de Janeiro: Atheneu; 1964. 477 p.

Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 2000 Mar;33(2):126-31.

Harrison JW, Wagner GW, Henry CA. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. *J Endod* 1990 Jul;16(7):328-30.

Ingle JI, Zeldow, BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and the negative culture in endodontic therapy. *J Am Dent Assoc* 1958;50:471.
J Endod. 2008 Dec;34(12):1508-14. Epub 2008 Oct 11.

Jaminet F, Delattre L, Delporte JP, Moes A. Effect of temperature of sterilization and of pH on stability of chlorhexidine in solution. *Pharm Acta Helv.* 1970 Jan;45(1):60-3.

Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994 Jun;20(6):276-8.

Kacmar, P, Pistl J, Mikula I. The effect of p- chloroaniline on leukocytes of sheep peripheral blood under the migration-inhibition test conditions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* v. 17, n. 3, p. 577-584, 1995.

Kehdy FS. Micronúcleos. Departamento de Biologia Geral ICB-UFMG Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/> Acesso em: 15 Dez. 2011.

Kim HS, Zhu Q, Baek SH, Jung IY, Son WJ, Chang SW, Lee W, Gu Y, Lee Y, Hong ST, Bae KS, Kim JW, Cho K, Kum KY. Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. *J Endod.* 2012 Jan;38(1):112-6.

Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008 Jul;34(7):850-4.

Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 2010 Jul;36(7):1154-7.

Kuruville JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998 Jul;24(7):472-6.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999 Mar;25(3):167-71.

Lima KC, Fava LRG, Siqueira Jr, JF. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001 Oct;27(10):616-9.

Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod* 2007 Feb;33(2):114-8.

Marchesan MA, Pasternak Júnior B, Afonso MM, Sousa-Neto MD, Paschoalato C. Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 May;103(5):e103-5.

Nowicki JB, Sem DS. An *in vitro* spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod*. 2011 Jul;37(7):983-8.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004 Jan;37(1):38-41.

Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. *In vitro* antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 May;103(5):702-6.

Oliveira LD, Carvalho CA, Nunes W, Valera MC, Camargo CH, Jorge AO. Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Oct;104(4):e125-8. 2007 Jul 26.

Paiva JG de, Antoniazzi JH. 2ª. ed. Endodontia: bases para a pratica clínica. 2ª. ed. São Paulo: Artes Medicas; 1988.

Patil CR, Uppin V. Effect of endodontic irrigating solutions on the microhardness and roughness of root canal dentin: an *in vitro* study. *Indian J Dent Res*. 2011 Jan-Feb;22(1):22-7.

Plotino G, Grande NM, Testarelli L, Gambarini G. Cyclic fatigue of Reciproc and WaveOne reciprocating instruments. *Int Endod J*. 2012 Jan 23.

Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod*. 2008 Dec;34(12):1521-3. Epub 2008 Oct 11.

Ribeiro DA. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Feb;105(2):251-6. Review.

Ribeiro DA, Scolastici C, De Lima PL, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 May;99(5):637-40.

Ribeiro DA, Bazo AP, da Silva Franchi CA, Marques ME, Salvadori DM. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. *J Periodontal Res*. 2004 Oct;39(5):358-61.

Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod* 1982 May;8(5):200-4.

Santos JN, Carrilho MR, De Goes MF, Zaia AA, Gomes BP, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. *J Endod*. 2006 Nov;32(11):1088-90. Epub 2006 Sep 15.

Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* 1999 Apr;25(4):235-8.

Siqueira Jr JF. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997. 130p.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J* 2002 Sep;35(9):735-9.

Thomas JE, Sem DS. An *in vitro* spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):315-7. Epub 2009 Dec 14.

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod* 2007 Nov;33(11):1283-9.

White RR, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigant used with sodium hypochlorite. *Am J Dent* 1999 Jun;12(3):148-50.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997 Apr;23(4):229-31.

Yeung SY, Huang CS, Chan CP, Lin CP, Lin HN, Lee PH, Jia HW, Huang SK, Jeng JH, Chang MC. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J*. 2007 Nov;40(11):837-44. Epub 2007 Sep 18. Erratum in: *Int Endod J*. 2008 Mar;41(3):272.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32:389–98.

Zong Z. Studies on the mechanisms of solid state and solution instability of drugs. [dissertation]. University of Iowa; 2011. [cited 2012 Feb 12]. Available: <http://ir.uiowa.edu/etd/2795>.

Apêndice

Apêndice A – Tabelas de Estatísticas, fonte: Nilton Azambuja Junior.

Notes									
Output Created		09-Jul-2012 23:43:08							
Comments									
Input	Active Dataset	DataSet0							
	Filter	<none>							
	Weight	<none>							
	Split File	<none>							
	N of Rows in Working Data File	6							
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.							
	Cases Used	Statistics for each table are based on all the cases with valid data in the specified range(s) for all variables in each table.							
Syntax		CROSSTAB /TABLES=VAR000001 BY VAR000002 /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTICS=CHISQ /CELLS=COUNT EXPECTED ASRESID /COUNT ROUND CELL /METHOD=EXACT TIMER(5).							
Resources	Processor Time	00 00:00:00.016							
	Elapsed Time	00 00:00:00.016							
	Dimensions Requested	2							
	Cells Available	174762							
	Time for Exact Statistics	00:00:00.010							
(DataSet0)									
Case Processing Summary									
	Cases								
	Valid		Missing		Total				
	N	Percent	N	Percent	N	Percent			
VAR000001 * VAR000002		6	100,0%	0	,0%	6	100,0%		
VAR000001 * VAR000002 Crosstabulation									
			VAR000002						Total
			chr0.25	chr0.5	liq 0.5	liq0.25	soi0.25	soi0.5	
VAR000001	1.0000	Count	0	0	1	0	0	1	2
		Expected Count	,3	,3	,3	,3	,3	,3	2,0
		Adjusted Residual	-,8	-,8	1,3	-,8	-,8	1,3	
	2.0000	Count	1	0	0	1	1	0	3
		Expected Count	,5	,5	,5	,5	,5	,5	3,0
		Adjusted Residual	1,1	-,1	-,1	1,1	1,1	-,1	
	3.0000	Count	0	1	0	0	0	0	1
		Expected Count	,2	,2	,2	,2	,2	,2	1,0
		Adjusted Residual	-,5	2,4	-,5	-,5	-,5	-,5	
Total		Count	1	1	1	1	1	1	6
		Expected Count	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	6,0
Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)					
Pearson Chi-Square		12,000 ^a	10	,283	1,000				
Likelihood Ratio		12,137	10	,276	1,000				
Fisher's Exact Test		11,311			1,000				
N of Valid Cases		6							

PDH3 Anova 2 critérios Tukey							
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ					
Tratamentos	11	443874,2171					
Blocos	23	4544,856					
Erro	253	3450,436					
F (tratamentos) =	2958,7877						
p (tratamentos) =	< 0,0001		2,1815				
F (blocos) =	14,489		9,8328				
p (blocos) =	< 0,0001		52,3656				
			96,4425				
			4,4033				
			26,3713				
			70,9034				
			100,7068				
			9,1204				
			20,8645				
			89,0821				
			102,5221				
Tukey	Q	(p)	Tukey	Q	(p)	Médias (blocos):	
Médias (1 a 2) =	10,1498	< 0,01	Médias (4 a 8) =	5,6568	< 0,01	Média (Linha 1) =	55,0887
Médias (1 a 3) =	66,5725	< 0,01	Médias (4 a 9) =	115,8386	< 0,01	Média (Linha 2) =	53,1701
Médias (1 a 4) =	125,0434	< 0,01	Médias (4 a 10) =	100,2592	< 0,01	Média (Linha 3) =	49,8559
Médias (1 a 5) =	2,9473	ns	Médias (4 a 11) =	9,7641	< 0,01	Média (Linha 4) =	46,3976
Médias (1 a 6) =	32,0892	< 0,01	Médias (4 a 12) =	8,065	< 0,01	Média (Linha 5) =	43,3717
Médias (1 a 7) =	91,1641	< 0,01	Médias (5 a 6) =	29,1419	< 0,01	Média (Linha 6) =	39,3372
Médias (1 a 8) =	130,7002	< 0,01	Médias (5 a 7) =	88,2168	< 0,01	Média (Linha 7) =	53,6822
Médias (1 a 9) =	9,2048	< 0,01	Médias (5 a 8) =	127,7529	< 0,01	Média (Linha 8) =	51,0983
Médias (1 a 10) =	24,7842	< 0,01	Médias (5 a 9) =	6,2575	< 0,01	Média (Linha 9) =	48,5788
Médias (1 a 11) =	115,2793	< 0,01	Médias (5 a 10) =	21,8369	< 0,01	Média (Linha 10) =	46,5117
Médias (1 a 12) =	133,1084	< 0,01	Médias (5 a 11) =	112,332	< 0,01	Média (Linha 11) =	45,0904
Médias (2 a 3) =	56,4227	< 0,01	Médias (5 a 12) =	130,1611	< 0,01	Média (Linha 12) =	42,4418
Médias (2 a 4) =	114,8936	< 0,01	Médias (6 a 7) =	59,0748	< 0,01	Média (Linha 13) =	54,9956
Médias (2 a 5) =	7,2025	< 0,01	Médias (6 a 8) =	98,611	< 0,01	Média (Linha 14) =	51,9624
Médias (2 a 6) =	21,9394	< 0,01	Médias (6 a 9) =	22,8844	< 0,01	Média (Linha 15) =	50,5798
Médias (2 a 7) =	81,0142	< 0,01	Médias (6 a 10) =	7,3051	< 0,01	Média (Linha 16) =	48,6173
Médias (2 a 8) =	120,5504	< 0,01	Médias (6 a 11) =	83,1901	< 0,01	Média (Linha 17) =	47,0563
Médias (2 a 9) =	0,945	ns	Médias (6 a 12) =	101,0192	< 0,01	Média (Linha 18) =	45,1828
Médias (2 a 10) =	14,6343	< 0,01	Médias (7 a 8) =	39,5361	< 0,01	Média (Linha 19) =	53,0865
Médias (2 a 11) =	105,1295	< 0,01	Médias (7 a 9) =	81,9592	< 0,01	Média (Linha 20) =	51,3888
Médias (2 a 12) =	122,9686	< 0,01	Médias (7 a 10) =	66,3799	< 0,01	Média (Linha 21) =	50,0309
Médias (3 a 4) =	58,4709	< 0,01	Médias (7 a 11) =	24,1153	< 0,01	Média (Linha 22) =	48,9606
Médias (3 a 5) =	63,6252	< 0,01	Médias (7 a 12) =	41,9444	< 0,01	Média (Linha 23) =	47,3765
Médias (3 a 6) =	34,4833	< 0,01	Médias (8 a 9) =	121,4954	< 0,01	Média (Linha 24) =	45,7408
Médias (3 a 7) =	24,5916	< 0,01	Médias (8 a 10) =	105,916	< 0,01		
Médias (3 a 8) =	64,1277	< 0,01	Médias (8 a 11) =	15,4209	< 0,01		
Médias (3 a 9) =	57,3677	< 0,01	Médias (8 a 12) =	2,4082	ns		
Médias (3 a 10) =	41,7883	< 0,01	Médias (9 a 10) =	15,5794	< 0,01		
Médias (3 a 11) =	48,7068	< 0,01	Médias (9 a 11) =	106,0745	< 0,01		
Médias (3 a 12) =	66,5359	< 0,01	Médias (9 a 12) =	123,9036	< 0,01		
Médias (4 a 5) =	122,0961	< 0,01	Médias (10 a 11) =	90,4951	< 0,01		
Médias (4 a 6) =	92,9541	< 0,01	Médias (10 a 12) =	108,3242	< 0,01		
Médias (4 a 7) =	33,8793	< 0,01	Médias (11 a 12) =	17,8291	< 0,01		

Tabela 2 - PDH3 Anova com Tukey

Anova FMM1 Tukey							
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM				
Tratamentos	11	45.0 e+04	40.9 e+03				
Erro	276	10.2 e+03	37.045				
F =	1105.3953						
(p) =	< 0.0001						
Média (Coluna 1) =	2.4911						
Média (Coluna 2) =	5.3653						
Média (Coluna 3) =	32.7028						
Média (Coluna 4) =	100.0727						
Média (Coluna 5) =	2.4397						
Média (Coluna 6) =	25.3011						
Média (Coluna 7) =	80.1497						
Média (Coluna 8) =	100.2798						
Média (Coluna 9) =	4.0329						
Média (Coluna 10) =	30.6769						
Média (Coluna 11) =	73.5484						
Média (Coluna 12) =	100.1514						
Tukey:	Diferença	B	(p)	Tukey:	Diferença	B	(p)
Médias (1 e 2) =	2.8743	2.8903	ns	Médias (4 e 8) =	0.2071	2.8903	ns
Médias (1 e 3) =	30.2117	2.8903	< 0.05	Médias (4 e 9) =	96.0398	2.8903	< 0.05
Médias (1 e 4) =	97.5816	2.8903	< 0.05	Médias (4 e 10) =	69.3958	2.8903	< 0.05
Médias (1 e 5) =	0.0513	2.8903	ns	Médias (4 e 11) =	26.5243	2.8903	< 0.05
Médias (1 e 6) =	22.8100	2.8903	< 0.05	Médias (4 e 12) =	0.0787	2.8903	ns
Médias (1 e 7) =	77.6586	2.8903	< 0.05	Médias (5 e 6) =	22.8613	2.8903	< 0.05
Médias (1 e 8) =	97.7887	2.8903	< 0.05	Médias (5 e 7) =	77.7100	2.8903	< 0.05
Médias (1 e 9) =	1.5418	2.8903	ns	Médias (5 e 8) =	97.8401	2.8903	< 0.05
Médias (1 e 10) =	28.1859	2.8903	< 0.05	Médias (5 e 9) =	1.5931	2.8903	ns
Médias (1 e 11) =	71.0573	2.8903	< 0.05	Médias (5 e 10) =	28.2372	2.8903	< 0.05
Médias (1 e 12) =	97.6604	2.8903	< 0.05	Médias (5 e 11) =	71.1086	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 3) =	27.3375	2.8903	< 0.05	Médias (5 e 12) =	97.7117	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 4) =	94.7074	2.8903	< 0.05	Médias (6 e 7) =	54.8487	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 5) =	2.9256	2.8903	< 0.05	Médias (6 e 8) =	74.9788	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 6) =	19.9357	2.8903	< 0.05	Médias (6 e 9) =	21.2682	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 7) =	74.7844	2.8903	< 0.05	Médias (6 e 10) =	5.3759	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 8) =	94.9145	2.8903	< 0.05	Médias (6 e 11) =	48.2473	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 9) =	1.3325	2.8903	ns	Médias (6 e 12) =	74.8504	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 10) =	25.3116	2.8903	< 0.05	Médias (7 e 8) =	20.1301	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 11) =	68.1830	2.8903	< 0.05	Médias (7 e 9) =	76.1168	2.8903	< 0.05
Médias (2 e 12) =	94.7861	2.8903	< 0.05	Médias (7 e 10) =	49.4728	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 4) =	67.3699	2.8903	< 0.05	Médias (7 e 11) =	6.6013	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 5) =	30.2631	2.8903	< 0.05	Médias (7 e 12) =	20.0017	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 6) =	7.4017	2.8903	< 0.05	Médias (8 e 9) =	96.2469	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 7) =	47.4469	2.8903	< 0.05	Médias (8 e 10) =	69.6029	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 8) =	67.5770	2.8903	< 0.05	Médias (8 e 11) =	26.7315	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 9) =	28.6699	2.8903	< 0.05	Médias (8 e 12) =	0.1284	2.8903	ns
Médias (3 e 10) =	2.0258	2.8903	ns	Médias (9 e 10) =	26.6441	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 11) =	40.8456	2.8903	< 0.05	Médias (9 e 11) =	69.5155	2.8903	< 0.05
Médias (3 e 12) =	67.4487	2.8903	< 0.05	Médias (9 e 12) =	96.1186	2.8903	< 0.05
Médias (4 e 5) =	97.6330	2.8903	< 0.05	Médias (10 e 11) =	42.8714	2.8903	< 0.05
Médias (4 e 6) =	74.7716	2.8903	< 0.05	Médias (10 e 12) =	69.4745	2.8903	< 0.05
Médias (4 e 7) =	19.9230	2.8903	< 0.05	Médias (11 e 12) =	26.6031	2.8903	< 0.05

Tabela 3 - FMM1 Anova com Tukey

Anexos

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, Parte 2 - Biológica – Estudo da Citotoxicidade dentro do **Projeto da Análise da associação hipoclorito de sódio e clorexidina** sob supervisão do Prof.Dr. Giulio Gavini (parte 1 – Análise da reação química e 3 – resposta inflamatória do tecido conjuntivo do rato).

The logo of the University of São Paulo (USP) is located on the left side of the document. It features a circular emblem with a shield in the center, surrounded by the text 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO' and 'FACULDADE DE ODONTOLOGIA'. Below the emblem is the acronym 'USP/FOD'.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 25/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, APROVOU o protocolo de pesquisa: **"Análise da reação química, citotoxicidade e resposta inflamatória do tecido conjuntivo do rato frente à associação hipoclorito de sódio e clorexidina"**, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a): Guilherme Henrique Rosa Martins, Marina Beloti Ferreira, Nilton Azambuja Júnior, Thiago Cardoso Bulhões Brum, sob orientação do Professor(a) Doutor(a) Giulio Gavini.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01 (um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 14 de outubro de 2009.

A handwritten signature in black ink, belonging to Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, is positioned above the printed name and title.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - Telef./FAX (0XX11) 3091-7887