

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE CLORHEXIDINA Y
DIHIDROCLORURO DE OCTENIDINA EN CÉLULAS EPITELIALES.”**

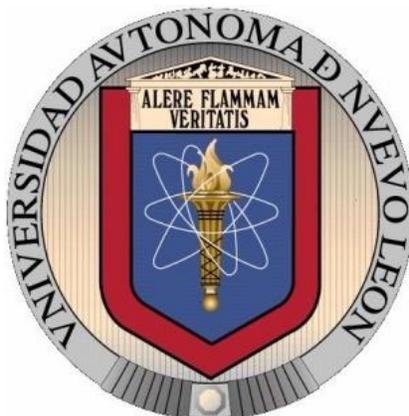
POR

CARLOS EDUARDO GALVÁN CAUDILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA**

SEPTIEMBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE CLORHEXIDINA Y
DIHIDROCLORURO DE OCTENIDINA EN CÉLULAS EPITELIALES.”**

POR

CARLOS EDUARDO GALVÁN CAUDILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. CLAUDIO CABRAL ROMERO
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ HERNÁNDEZ DELGADILLO**

SEPTIEMBRE, 2016

Facultad de Odontología

Subdirección del área de estudios de posgrado

Los miembros del jurado aceptados la investigación y aprobamos el documento que avala la misma, que como opción a obtener el grado de

Maestría en Odontología Avanzada

Presenta el CD. Carlos Eduardo Galván Caudillo

"Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título segundo, capítulo I, artículo 17, sección I, investigación sin riesgo y no requiere consentimiento informado.

ACEPTADOS

Comité de Tesis

Director de Tesis

Secretario

Vocal

Asesores de la Tesis

Dr. Claudio Cabral Romero

Director

Dr. Rene Hernández Delgadillo

Co- Director

Agradecimientos

Gracias Dios por el regalo de vivir y por ser el motor que me impulsa; gracias por ser luz en mi oscuridad, mi camino, verdad y guía; por permitirme vivir esta hermosa experiencia llena de inolvidables momentos, aprendizaje.

A mi director de Tesis el Dr. Claudio Cabral Romero por su confianza al darme la oportunidad de realizar este proyecto tan importante en mi vida profesional, por asesorarme , guiarme y apoyarme durante este proyecto y por ser una persona muy profesional a quien admiro y aprecio Estoy y estaré a su disposición en cualquier ámbito, en cualquier tiempo. Gracias.

A mi Co-director el Dr. Rene Hernández Delgadillo por todo el apoyo de me brindo durante este proyecto y los consejos, por su valioso tiempo que dedico y por la amistad de mucho tiempo. Que será para siempre.

A mi esposa Eileen Coss por todo el apoyo que me brindo, mi confidente, mi mejor amiga y el amor de mi vida, llegaste a mi vida en el momento más indicado.

Mi mama, la mejor mamá, consejera, mi mayor inspiración y ejemplo a seguir. Gracias por darme la vida y cuidarla con eterno amor, por educarme, por tu gran sacrificio, apoyo incondicional y comprensión siempre, pero en especial a lo largo de estos dos años de Posgrado

Mis hermanos, gracias por estar siempre a mi lado, dándole sentido a mi vida, aprecio su sacrificio, son el regalo más grande que Dios me dio, los amo y les dedico este éxito.

A mi coordinadora del posgrado la Dra. Norma Cruz Fierro por las atenciones que tuvo conmigo en este tiempo del posgrado y el tiempo que me dedico durante el.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Índice

Sección	Página
HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO	2
COMITÉ DE TESIS.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
NOMENCLATURA.....	8
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. ANTECEDENTES.....	22
4.1 Mecanismos de higiene y enjuagatorios de la salud oral.....	23
4.2 Propiedades de la clorhexidina.....	24
4.3 Mecanismo de acción.....	26
4.4 Propiedades farmacocinéticas y efectos secundarios.....	27
4.5 Citotoxicidad de la Clorhexidina.....	27
4.6 Propiedades del Dihidrocloruro de octenidina.....	29
4.7 Uso en odontología.....	30
4.8 Mecanismo de acción.....	31
4.9 Efecto antimicrobiano.....	31
4.1.1 Aspectos farmacocinéticos.....	32
4.1.2 Citotoxicidad del Octenidina.....	32
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
6. JUSTIFICACIÓN.....	36
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
7.1 Cultivo celular.....	39
7.2 Efecto de la Octenidina sobre células epiteliales humanas por ensayo del MTT.....	39
7.3 Influencia de clorhidrato de Octenidina en las células MA104 y HeLa por microscopía de fluorescencia.....	41

7.4 Impacto de Octenidina en el ADN genómico de las células epiteliales de Ensayo Cometa.....	42
7.5 Respuesta inflamatoria de las células epiteliales a Octenidina.....	43
7.6 Efecto apoptótico de OCT en células epiteliales.....	43
8. RESULTADOS	45
8.1 Citotoxicidad de Octenidina sobre células epiteliales humanas.....	46
8.2 Efecto de Octenidina en el ADN genómico de las células epiteliales.....	49
8.3 Respuesta inflamatoria de las células epiteliales a Octenidina.....	50
8.4 Efecto apoptótico de OCT en las células epiteliales humanas.....	51
9. DISCUSIÓN.....	53
10. CONCLUSIONES.....	57
11. LITERATURA CITADA	59
12. APÉNDICE.....	71

Nomenclatura

OCT._ Octenidina

CHX._ Clorhexidina

IL-6._ Interleucina-6

MCF-7._ Es una línea celular del cáncer epiteliales usada ampliamente, derivada del adenocarcinoma de pecho

MTT._ Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

HeLa._ Henrietta Lacks

MEM._ Medio esencial mínimo.

DMSO._ Dimetilsulfóxido.

ADN._ es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas.

RT-PCR._ Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. "

SARM._ *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina.*

PDL._ Células del ligamento periodontal.

PVP._ La povidona es un polímero soluble en agua

CS._ Sulfato de condroitina.

Listado de tablas y figuras

<i>Figura 1.</i> Estructura química de la Clorhexidina.....	24
<i>Figura 1.2</i> Estructura química del Hidrocloruro de Octenidina.....	30
<i>Figura 2.</i> Líneas celulares de crecimiento y condiciones de crecimiento.....	39
<i>Figura 2.1</i> Fundamento del Ensayo de viabilidad MTT.....	40
<i>Figura 2.2</i> Efecto de la octenidina sobre células epiteliales mediante el ensayo de viabilidad MTT.....	41
<i>Figura 2.3.</i> Ensayo de Calceína AM y microscopía de fluorescencia.....	42
<i>Figura 3.</i> Efecto de octenidina sobre las células epiteliales humanas.....	47
<i>Figura 3.1</i> Tiempo - efecto de Octenidina sobre las células epiteliales humanas. .	48
<i>Figura 3.2</i> Citotoxicidad de Octenidina en células epiteliales humanas por microscopía de fluorescencia.....	49
<i>Figura 3.3.</i> Genotoxicidad de Octenidina sobre células epiteliales humanas mediante el ensayo cometa y microscopía de fluorescencia.	50
<i>Figura 3.4</i> Respuesta inflamatoria de las células humanas a Octenidina.	51
<i>Figura 3.5</i> Efecto apoptótico de bajas concentraciones de Octenidina sobre células humanas.....	52

Resumen

El clorhidrato de octenidina se emplea como ingrediente principal de enjuagues bucales debido a sus propiedades bactericidas y antibiopelícula. Aunque la octenidina es ampliamente utilizada, no hay reportes previos que indiquen su posible efecto tóxico en los seres humanos. El objetivo de esta investigación fue analizar la citotoxicidad de la octenidina en las células epiteliales humanas (HeLa). Células HeLa fueron cultivadas y expuestas a varias concentraciones de octenidina y la viabilidad celular se midió mediante ensayos de MTT. Los resultados obtenidos mostraron que no había células vivas después de 24 hrs de incubación al ser tratadas con 0,0125 a 0,05% de octenidina. Sorprendentemente, las mismas concentraciones de octenidina mataron a todas las células HeLa después de sólo 5 minutos de exposición. Estos datos fueron apoyados por la observación de las células HeLa cultivadas con octenidina por microscopía de fluorescencia, que indican el daño en la membrana plasmática, probablemente alterando su permeabilidad. Empleando ensayos de genotoxicidad, se encontró que la octenidina causa lesiones en el ADN genómico cuando se encuentra en cultivos de células HeLa. Las concentraciones más bajas de octenidina indujeron un aumento de los niveles de IL-6 en las células HeLa, sin embargo, no promueve la apoptosis entre las células epiteliales. Como conclusión; la octenidina causa un alta toxicidad en células humanas, por lo tanto los efectos benéficos y nocivos de la octenidina en los seres humanos deben ser valorados en estudios *in vivo*.

Palabras clave

Citotoxicidad, enjuague bucal, Octenidol, Clorhidrato de octenidina, efecto toxico

Abstract

Octenidine hydrochloride is employed as main ingredient of mouth washes based on its bactericidal and antibiofilm properties. Although octenidine is widely used, there are no reports studying its possible toxic effect on humans. The aim of this research was to analyze the cytotoxicity of octenidine on human epithelial cells (HeLa). HeLa cells were cultured and exposed to several concentrations of octenidine and cell viability was measured by MTT assays. The findings showed no living cells were detected after 24 hrs. of HeLa cells growing in presence of 0.0125-0.05% octenidine. Surprisingly, same concentrations of octenidine kill all HeLa cells after only 5 minutes of exposition. These data were supported by observing HeLa cells grown with octenidine by fluorescence microscopy, indicating damage in plasmatic membrane, probably altering their permeability. Employing genotoxicity assays, it was found that octenidine cause injury to genomic DNA when it was added to HeLa cells cultures. Lower concentrations of octenidine induced an increasing of levels of IL6 in HeLa cells, however did not promote apoptosis among epithelial cells. As conclusion octenidine cause high toxicity on human cells, therefore beneficial and potential harmful effects of octenidine on humans must be weighed in further studies in vivo.

Key words

Cytotoxicity, Mouth washes, Octenidol, Octenidine Hydrochloride, Toxic effect.

Introducción

La boca ofrece un entorno propicio para la colonización y el crecimiento de una amplia gama de microorganismos, de los cuales las bacterias son los más comunes y numerosos. Las mayores acumulaciones de bacterias son encontradas como biopelículas en la superficie de los dientes (placa dental); la carga microbiana es menor en las superficies mucosas (Van Strydonck y cols, 2012; Chainani y cols, 2014). Una amplia gama de agentes se han formulado en productos de cuidado oral con el fin de mejorar el control de la placa (Scheie, 2008; Brading, 2003; Baehni, 2003).

Los colutorios son preparaciones líquidas destinadas a ser aplicadas sobre los dientes, las mucosas de la cavidad oral y faringe con el fin de ejercer una acción local antiséptica, astringente o calmante. El vehículo más comúnmente utilizado en los colutorios es el agua y los principios activos son principalmente antisépticos, antibióticos, antifúngicos, astringentes y antiinflamatorio (Carretero y cols, 2004).

En la actualidad los antisépticos en odontología se han utilizado como desinfectantes de heridas, para el control de placa bacteriana post-quirúrgico y como parte de la fase del mantenimiento periodontal para prevenir septicemia haciendo un enjuague preoperatorio, además de medida para disminuir la propagación de microorganismos presentes en el aerosol generado por instrumentos rotatorios, sónicos y ultrasónicos (Torres, 2012).

Estos agentes pueden inhibir la formación de placa por la inhibición de la proliferación bacteriana y/o por un efecto de tipo bactericida por medio del cual el agente antibacteriano destruye todos los microorganismos que se están adhiriendo o que ya están adheridos a la superficie dental. En la actualidad la mayor parte de los agentes antiplaca son antimicrobianos e impiden la fase de proliferación bacteriana en el desarrollo de la placa (Carretero y cols, 2004; Wu, 2002).

Actualmente muchos enjuagues de gran efectividad clínica y microbiológica contienen clorhexidina como ingrediente activo. Clorhexidina(CHX) al 0.12% ha sido ampliamente usada para matar bacterias orales y mantener la salud oral, sin embargo el potente

efecto biocida no es exclusivo para microorganismos (Jones, 1997). Muchos estudios reportan un importante efecto citotóxico en una variedad de células (Louis, 1985; Kenney y cols, 1972; Knuuttila, 1981; Heleland y cols, 1971; Pucher, 1992).

El hidrocloreuro de octenidina (OCT) es un derivado de la bispiridina. Un enjuague bucal al 0.1% de OCT es efectivo para reducir la acumulación de placa y gingivitis (Patters y cols, 1983) Incluso se ha demostrado que OCT es más efectivo que clorhexidina al menos en cuanto a la prolongada actividad bacterial antiadhesiva (Decker y cols, 2003). Las propiedades antimicrobiales de octenidina son incuestionables, sin embargo su citotoxicidad no ha sido ampliamente explorada. En este trabajo se analizó el efecto tanto de clorhexidina como de octenidina en las células epiteliales humanas y de riñón de mono para valorar el grado de citotoxicidad. Encontrando que la OCT al 0.1% como también la CHX al 0.12% presentaron una elevada toxicidad en las células epiteliales humanas, que nos sugiere que el uso prolongado de estos productos podría ser perjudiciales para las personas, esto nos hace una llamado para crear nuevas alternativas para nobles para el uso en seres humanos.

Hipótesis

La clorhexidina y el hidrocloreuro de octenidina (OCT) presentan un efecto tóxico importante en células epiteliales humanas.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el nivel de citotoxicidad de la clorhexidina e hidrocloreuro de octenidina en células epiteliales humanas

Objetivos Específicos

Determinar la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT de cultivos celulares de humano expuestos a diferentes concentraciones de OCT y CHX.

Evaluar el posible efecto genotóxico de octenidina y clorhexidina sobre células humanas.

Determinar si octenidina y clorhexidina tiene la capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria.

Analizar si octenidina y clorhexidina promueven apoptosis entre las células epiteliales humanas.

Antecedentes

Mecanismos de higiene y enjuagatorios de la salud oral

El control efectivo de la placa es fundamental para mantener la salud oral (Yankell y cols, 1982). Es por eso que el cepillado de los dientes, es el medio más difundido de limpieza dental y buena salud gingival, la cual a su vez puede ser afectada por la mala técnica y el tiempo de cepillado. Aunque las cerdas de los cepillos de dientes verticales convencionales eliminan la placa de superficies planas y accesibles, son menos eficaces en los márgenes gingivales y en zonas proximales, donde la acumulación de placa conlleva a la aparición de gingivitis y el deterioro de la salud periodontal (Warren y cols, 2007; Beals, 2000). Por tal motivo el uso exclusivo de un cepillo dental no garantiza una higiene dental completa.

Actualmente existen en el mercado varios productos químicos inhibidores de placa, tales como antisépticos. Los antisépticos son biocidas o sustancias químicas que se aplican sobre los tejidos vivos, con la finalidad de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. No tienen actividad selectiva ya que eliminan todo tipo de gérmenes. A altas concentraciones pueden ser tóxicos para los tejidos vivos. Su uso estrictamente externo debe responder a un doble criterio de eficacia e inocuidad. Su objetivo debe ser eliminar o destruir los microorganismos presentes en la piel sin alterar las estructuras. Terapéuticamente hablando, el papel de los antisépticos es el de coadyuvar con los medios naturales de defensa de la piel en el control de los microorganismos patógenos responsables de las infecciones cutáneas primitivas (Marshall, 1985; Grupo Nacional para el Estudio y asesoramiento en úlceras por presión y heridas crónicas, 2002).

Dentro del área dental, los antisépticos son muy utilizados. La caries dental, la gingivitis y la periodontitis son las enfermedades microbianas más comunes de la cavidad oral, la mayoría asociado con un biofilm polimicrobiano.

Los enjuagues bucales antimicrobianos son una de las principales estrategias terapéuticas y preventivas que actualmente se utilizan en el tratamiento de enfermedades derivadas del biofilm oral (Peyyala, 2013; Yamakami y cols, 2013).

Propiedades de Clorhexidina

La clorhexidina (CHX) es ampliamente aceptado como el "estándar de oro" de los antisépticos orales (Herrera, 2013). Este agente antiséptico tiene una actividad superior a sus comparadores, y es a la vez bactericida y bacteriostático contra los microorganismos presentes en los biofilms orales con papeles en la patogénesis de la enfermedad oral.

La CHX es un agente antibacteriano ampliamente utilizado para la desinfección de la piel, la desinfección preoperatoria de todo el cuerpo, y la prevención y el tratamiento de la enfermedad oral debido a su amplio espectro de eficacia, la retención por la piel y mucosa, y bajo riesgo de complicaciones alérgicas (McDonnell, 1999).

En cuanto a su estructura, la CHX es una molécula bicationica simétrica consistente en dos anillos: cuatro clorofenil y dos grupos bisguanida conectados por una cadena central de hexametileno (Fardal, 1986). Debido a las propiedades catiónicas de la clorhexidina se une a la hidroxiapatita del esmalte, a la película adquirida y a las proteínas salivales. La clorhexidina absorbida se libera gradualmente desde el diente y se piensa que esto puede ocurrir durante las 24 horas después de su absorción con lo que se evita la colonización bacteriana en este tiempo (Case, 1977).

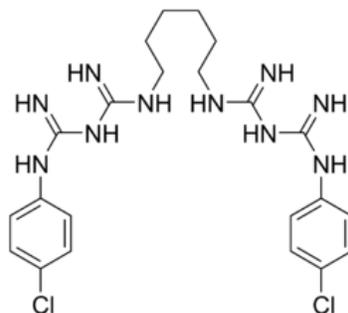


Figura 1. Estructura química de la Clorhexidina (Fardak, 1985).

Aunque la CHX comenzó a ser utilizada para el control de la placa bacteriana en 1959, su uso se generalizó en odontología en la década de 1970 después de la publicación de los estudios realizados por Løe y Schiött (Schiott y cols, 1970; Lindhe y cols, 1970). Además de sus efectos sobre la placa dental y la gingivitis, CHX es eficaz en la prevención y tratamiento de las caries infecciones secundarias a los procedimientos quirúrgicos orales, y en el mantenimiento de la salud de los tejidos peri-implante (Epstein y cols, 1991; Clark y cols, 1991). La CHX reduce la carga bacteriana de los aerosoles y reduce la bacteriemia después de la manipulación dental. También se emplea en el tratamiento de aftosas recurrentes y estomatitis relacionados con prótesis. CHX está indicado sobre todo en determinados grupos de población, como las personas con aparatos de ortodoncia, los discapacitados y los pacientes inmunológicamente comprometidos (Enrile de Rojas y cols, 2006). También se ha utilizado en Endodoncia como sustancia irrigante (Sigueira y cols, 2007; Greenstein, 1986; Jeansonne, 1994; Leonardo y cols, 1999; Ferraz y cols, 2001; Viana y cols, 2004; Ercan y cols, 2004).

En cuanto al espectro de actividad, CHX es bactericida y eficaz contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, facultativas y anaerobios estrictos, (Greenstein, 1986; Leonardo y cols, 1999; Ferraz y cols, 2001; Gomez y cols, 2001; Delany y cols, 1982; Oncag y cols, 2003, Dametto y cols, 2005, Basrani, 2005) levaduras y hongos, en particular *Candida albicans* (Viana y cols, 2004; Ferguson y cols, 2002). Es activo contra algunos virus (virus respiratorios, herpes, citomegalovirus, VIH) e inactivo contra las esporas bacterianas a temperatura ambiente (Westcoot y cols, 1989; Sigueira y cols, 1998, Gomes y cols, 2005). También conserva su actividad en la presencia de sangre y materias orgánicas (Gelinias, 1983).

La CHX siendo representante más característico de las bisguanidas y uno de los tres antisépticos quirúrgicos más importantes así como el antiséptico bucal que más se usa actualmente cuenta con gran eficacia y amplio espectro de actividad, buena sustentabilidad para la piel y baja irritación (Mcdonnell, 1999; Rosenberg y cols, 1976).

Además la CHX puede ser preparada como enjuagues bucales, barnices, geles y aparatos con liberación controlada de CHX.

La preparación oral más común es gluconato de clorhexidina, es una base y es estable como una sal, es soluble en agua y a pH fisiológico, se disocia y libera fácilmente el componente CHX cargado positivamente (Addy, 1997). A baja concentración (0,2%), actúa como bacteriostático, sustancias de bajo peso molecular como potasio y fósforo saldrán de la bacteria. Por otro lado, a una concentración más alta (2%), CHX es bactericida; provocando precipitación de contenido citoplásmico lo que resulta en la muerte celular (Procedimiento de curación: antisépticos y desinfectantes (Adams y cols, 2005).

Bascones y Manso en 1994 mencionan que a niveles bajos de pH y notoriamente ácidos se evidencia poca capacidad de retención por la molécula de clorhexidina, a diferencia de niveles neutros o ligeramente alcalinos, en las cuales exhibe mayor disposición de absorción. Su combinación con el alcohol incrementa la eficacia de esta sustancia. Las ventajas que justifican el empleo de la clorhexidina son la acción germicida rápida y su duración prolongada, gracias a que ésta sustancia tiene gran adhesividad a la piel y buen índice terapéutico. Su uso es seguro incluso en la piel de los recién nacidos y la absorción a través de la piel es mínima (Larson y cols, 1986; Gongwer y cols, 1980, Senior, 1973; O'Neill; y cols, 1982).

Mecanismo de acción.

La CHX es una molécula hidrofóbica y lipofílica con carga positiva que interactúa con fosfolípidos y lipopolisacáridos en la membrana celular de las bacterias y luego entra en la célula a través de algún tipo de mecanismo de transporte activo o pasivo (Athanasiasidis y cols, 2007). Su eficacia se debe a la interacción de la carga positiva de la molécula y los grupos fosfato cargados negativamente en las paredes celulares microbianas alterando así el equilibrio osmótico de las células. Esto aumenta la permeabilidad de la pared celular, lo que permite que la molécula de CHX penetre en las bacterias (Gomes y cols, 2003). Se ha demostrado que la absorción por difusión

pasiva a través de las membranas es extraordinariamente rápida tanto en las bacterias (Fitzgerald y cols, 1989), como en las levaduras (Hiom y cols, 1992), consiguiéndose un efecto máximo en 20 segundos. A bajas concentraciones produce una alteración de la permeabilidad osmótica de la membrana y una inhibición de las enzimas del espacio periplasmático. A concentraciones altas origina la precipitación de las proteínas y ácidos nucleicos (Arevalo y cols, 1998).

Propiedades farmacocinéticas y efectos secundarios.

Se han realizado diversos estudios para analizar su toxicidad. A nivel sistémico, la clorhexidina no manifiesta toxicidad (Case, 1977). Su absorción en el tracto gastrointestinal es pobre en caso de ingestión por tratarse de un agente de peso molecular relativamente alto (Case, 1977; Micromedex, 1988, Greenstein y cols, 1986). También se demostró que interiormente, si es ingerido, será excretado casi en su totalidad en las heces y, en cantidad reducido, por la orina. (Micromedex, 1988, Greenstein y cols, 1986; Litter, 1986). Según estudios realizados se observó que en personas susceptibles a reacciones de hipersensibilidad tipo 1, la CHX produjo erupciones cutáneas e hipotensión cuando se realizó su preparación preoperatorio de la piel (Greenstein y cols, 1986; Klimm y cols, 1989).

En cuanto al uso dental, Klimm y Col en 1989 afirmaron que no es más tóxico que otros antisépticos de uso modelo, incluso su potencial citotóxico es muy bajo comparado con el hipoclorito de sodio. El enjuague de CHX se asocia a un número variado de efectos colaterales locales indeseables, como el manchado extrínseco café de dientes y lengua, la alteración del sabor que puede durar varias horas, y menos frecuentemente la descamación de la mucosa oral (Pizzo y cols, 2006).

Citotoxicidad de la Clorhexidina.

La citotoxicidad es el grado en el que un agente tiene acción destructiva específica en ciertas células. Se han realizado varios estudios para medir la citotoxicidad de la

clorexhidina. En un estudio se hace la comparación de tres de los enjuagues bucales más conocidos que son la clorhexidina al 0.12%, la marca Listerine y Iodio-Povidona al 1%, se observó que los tres tienen efectos adversos en la proliferación de fibroblastos siendo el de mayor toxicidad la clorhexidina a concentraciones comerciales (Flemingson y cols, 2008).

Al analizar la citotoxicidad de CHX en cultivos celulares con diferentes líneas de células, se ha observado que la citotoxicidad no es en un tipo específico de célula. Estudios con CHX han mostrado efectos citotóxicos en fibroblastos humanos gingivales (Pucher, 1992), células humanas del ligamento periodontal (Chang y cols, 2001), células humanas de hueso alveolar (Cabral, 2007), así como en células osteoblásticas humanas (Lee y cols, 2010).

Gianelli y cols en 2008 investigó la citotoxicidad in vitro de CHX en células osteoblásticas, endoteliales y fibroblásticas. Se informó de que CHX afectó la viabilidad celular en una dosis y modales dependientes del tiempo, particularmente en los osteoblastos. Su efecto tóxico consistía en la inducción de muerte celular por apoptosis y autofagia así como en la alteración de la función mitocondrial, aumento de Ca^{2+} intracelular y estrés oxidativo.

En otra investigación se evaluó la CHX con ensayo cometa (electroforesis en gel de células individuales, o SCGE) y observó un aumento estadístico en el daño a las células bucales y células sanguíneas después de la aplicación de CHX. Se mencionó que el daño del ADN detectado después del uso de CHX podría ser la indicación de un efecto anterior, antes de que comenzara la reparación del ADN, y pudiese ser reversible (Eren y cols, 2002).

Muchos otros experimentos se han realizado en un intento de elucidar los mecanismos de acción de CHX y han demostrado su potencial citotóxico por la inhibición de la síntesis de proteínas (Pucher, 1992), la inducción de la apoptosis a concentraciones

bajas y necrosis a alta concentraciones (Faria y cols, 2007), así como la inhibición de la síntesis de ADN (Hidalgo, 2001).

Se ha demostrado que la exposición de fibroblastos dérmicos humanos cultivados con CHX en concentraciones iguales o mayores que 0,005% durante 3 h causan muerte celular (Chang y cols, 2001). Se ha demostrado que la exposición de fibroblastos L929 a una concentración CHX tan bajo como 0,016% durante 24 h aumentó la tasa de necrosis de estas células en 79,77% (Faria y cols, 2007) . Chang, y cols en el 2001, examinó los efectos de CHX en células del ligamento periodontal en células humanas cultivadas (PDL) in vitro, informado de que la exposición de fibroblastos del ligamento periodontal humanos a 0,125% CHX durante 120 s causó una inhibición casi completa de la actividad mitocondrial de estas células.

Un estudio más reciente con *Odontoblast-like cells MDPC-23* fueron cultivados y expuestos a CHX en soluciones a concentraciones de 0.12%, 0.2%, 1% and 2%. Después de la exposición a CHX durante cierto periodo de tiempo se evaluó el metabolismo celular (ensayo MTT) y la concentración de proteínas totales. La morfología celular se evaluó al microscopio electrónico de barrido. Se encontró que independientemente del tiempo de exposición todas las concentraciones CHX tenían un alto efecto citotóxico directo al cultivo de células MDPC – 23 (Lessa y cols, 2010).

Las variaciones metodológicas observadas en los estudios que investigaron los efectos CHX en cultivos de células puede explicar la diversidad de los resultados encontrados en la literatura.

También es importante entender que los efectos citotóxicos de CHX en cultivo celular son directamente dependientes de la dosis de exposición, frecuencia y duración, y también dependen de la composición del medio de exposición.

Hidrocloruro de Octenidina

Hidrocloruro de octenidina (OCT) fue desarrollado en el Instituto de Investigación de Sterling Winthrop como un potencial agente antimicrobiano tópico (Bailey y cols, 1984).

Este compuesto antimicrobiano de la familia de la bispiridina, ha sido desarrollado como un agente potencial antimicrobiano/antiplaca para su uso en la fórmula de enjuagues bucales (Slee, 1985; Shern y cols, 1985; Beiswanger y cols, 1990; Kocak y cols, 2009). Se ha demostrado que es un antiséptico de la membrana mucosa y también se utiliza en quemaduras graves y para la curación de heridas.

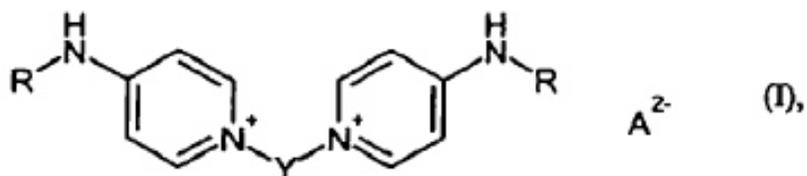


Figura 1.2 Estructura química del Hidrocloruro de Octenidina

Uso en odontología

Dentro del área odontológica, desde hace años el uso de OCT como enjuague bucal en concentración al 0,1 % proporcionaba reducciones estadísticamente significativas de placa, de gingivitis y sangrado gingival (Slee, 1983; Patters y cols, 1986; Pitten, 1999; Ghannoum y cols, 1990; Dogan y cols, 2008). Además hidrocloruro de Ocetnidina también se ha sugerido como un irrigante endodóntico basado en sus efectos antimicrobianos y baja citotoxicidad (Pitten, 1999).

Se ha informado de que inhibe la OCT la placa dental y caries en ratas, primates, y en humans (Slee, 1985; Patters y cols, 1986; Ghannoum y cols, 1990). Pitten y Kramer en 1999 mostraron que OCT tiene eficacia antimicrobiana en cavidades orales. Por otro lado, Shern y cols en 1985 realizó una comparación entre OCT y CHX como una solución de enjuague bucal en ratas y no encontró ninguna diferencia estadística entre el efecto de OCT y CHX en la formación de placa dental.

En otro estudio, Dogan y cols en el 2008 informaron los resultados de la eficacia antibacteriana de enjuagues bucales antisépticos comunes y OCT contra los

Streptococcus mutans y las especies *Lactobacillus*. Llegaron a la conclusión de que la actividad antibacteriana de OCT es favorable en comparación con Iodopovidona, y CHX tanto in vitro como in vivo.

Mecanismo de acción

Octenidina es un compuesto cargado positivamente que exhibe actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo la placa productora de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis* (Bailey y cols, 1984). Clorhidrato de Octenidina ejerce su actividad antimicrobiana mediante la unión a la envoltura celular bacteriana cargado negativamente, de ese modo altera las funciones vitales de la membrana celular y provocar la muerte a la bacteria. Tiene una alta afinidad por la cardiolipina, un lípido prominente en las membranas celulares bacterianas, por lo que es letal selectivamente a células bacterianas sin afectar adversamente a las células eucariotas (Brill y cols, 2006). Además, en un estudio se demostró que la exposición repetida de *Staphylococcus aureus* a octenidina en un tiempo de hasta 3 meses no indujo resistencia al compuesto (Al-Doori y cols, 2007), lo que sugiere un bajo potencial de las bacterias para desarrollar resistencia a octenidina.

Efecto antimicrobiano

Es eficaz contra levaduras y hongos (Ghannoum y cols, 1990; Brill y cols, 1990), bacterias Gram- negativos y -postive incluyendo actinomicetos, así como las bacterias formadoras de placa tales como *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans* y *S. Sanguis* (Patters y cols, 1986; Ghannoum y cols, 1990; Harke, 1989) Kramer y cols, 2008; Sedlock, 1985; Emilson y cols, 1981; Shern y cols, 1987). Otra característica de este antimicrobiano fue observada en un estudio donde se demostró que *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) no desarrolla resistencia ante octenidina incluso se demostró que Octenidina muestra una mayor eficacia como un inhibidor para las enzimas formadoras de placa de *S. mutans* que la clorhexidina (Bailey y cols, 1984).

Aspectos Farmacocinéticos

Octenidina se considera un medicamento antiséptico con propiedades farmacocinéticas óptimas (Kramer y cols, 2008; Sedlock, 1985). Es estable bajo exposición a la luz, temperatura y en rango de pH de 1.6 a 12.2 , y sus efectos antisépticos se retienen en la presencia de albúmina o mucina (Kramer y cols, 2008; Sedlock, 1985; Pitten y cols, 2003).

Hidrocloruro de Octenidina tiene un alto grado de seguridad y se ha encontrado seguro para desinfección de la piel en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea (Tienz y cols, 2005). Los estudios de toxicidad en una variedad de especies huéspedes han revelado que OCT no se absorbe a través de las membranas mucosas y el tracto gastrointestinal, y no hay informes de carcinogenicidad, genotoxicidad o mutagenicidad (Epstein, 1991; kramer y cols, 1993).

Citotoxicidad del Octenidina

Pocos estudios se han realizado para analizar el efecto citotóxico de OCT, estudios realizados in vitro han sugerido que agentes antisépticos son citotóxicos a fibroblastos y otros cultivos celulares (kramer y cols, 1993), sin embargo los estudios in vivo con OCT y los preparados que contienen OCT no han logrado demostrar un efecto adversos significantes.

En un estudio se analizó la tolerancia de OCT sobre el área vaginal, se demostró por electromicroscopía en un modelo ex vivo con la mucosa vaginal vital que mientras que el yodo PVP conduce a masivo daño de la mucosa dentro de los 5 minutos de uso, cuando se utiliza un producto basado en octenidina en las células superficiales que la capa intermedia no se ve afectado (Spitzbart, 1994).

Otro estudio realizado de OCT con el fin de analizar su citotoxicidad in vitro y su tolerancia en el entorno clínico y preclínico se llevó a cabo con OCT en combinación con fibroblastos, suero bovino, albúmina (BSA), sulfato de condroitina (CS), lecitina, colesterol y cardiolipina (Müller, 2008), investigando sus efectos microbicidas sobre la

E. coli y *S. aureus* in vitro para medir la citotoxicidad sobre fibroblastos dentro de un periodo de 30 minutos de contacto. Se encontró que sobre la base de la óptima concentración microbicida, OCT tuvo el más bajo nivel de efecto secundario citotóxico, y este se debilitaba aún más en presencia de proteínas o lípidos.

En un estudio más reciente, Jenull y cols en el 2015 examinaron cuales condiciones de cultivos permiten la supervivencia y la proliferación celular para investigar una posible modulación de la toxicidad a través de la matriz extracelular de proteoglicanos condroitin sulfato.

Se probaron fibroblastos y células MCF7 para el crecimiento mediante la prueba de MTT, y se evaluó la potencia de cicatrización de heridas con un ensayo de laceración. Los niveles de expresión de los genes implicados en el control de la cicatrización de heridas se evaluaron con RT-PCR.

Una exposición de 24 horas a la solución basada en OCT se encontró incompatible con el crecimiento celular.

En condiciones de cultivo celular la aplicación de la solución basada en OCT se puede observar sin toxicidad comparable a la aplicación mínima requerida para dar efecto bactericida completa. La Alteración de la toxicidad por la interacción con el sulfato de condroitina en cultivo celular sugiere una función similar en la matriz extracelular en el tejido intacto.

Planteamiento del Problema

Actualmente existen muchas soluciones antisépticas en el mercado para el control de la placa bacteriana. Uno de los más utilizados es el colutorio de Clorhexidina como coadyuvante de la higiene oral así como antiséptico durante la irrigación endodental, desde hace tiempo se ha demostrado que su uso aporta grandes beneficios, sin embargo a pesar de su efectividad existen diversos informes que reportan altos grados de citotoxicidad sobre distintos tipos de células.

El OCT ha demostrado también ser un antiséptico eficaz en la higiene oral. En cuanto a su posible citotoxicidad existen escasos informes que proporcionan información de este tipo. El objetivo de este trabajo fue determinar cuáles efectos secundarios pudieran presentarse sobre células epiteliales que estén en contacto con la OCT. Dentro de la metodología empleada se utilizó el ensayo de viabilidad celular MTT para medir el efecto de la OCT sobre el crecimiento de las células epiteliales de humano HeLa. El posible daño al DNA genómico se exploró mediante el ensayo cometa acoplado a microscopía de fluorescencia. Para evaluar inflamación se midieron los niveles de IL6 mediante ensayos de ELISA y finalmente la posible promoción a apoptosis se analizó mediante el ensayo de Anexina V y citometría de flujo. La información generada será de gran utilidad para evaluar el costo/beneficio acerca del uso prolongado de la OCT.

Justificación

El uso de colutorios bucales ha sido ampliamente utilizado para controlar la presencia de placa bacteriana, halitosis, gingivitis, etc. Se ha comprobado la eficacia del hidrocloreto de octenidina y clorhexidina sobre un amplio espectro bacteriano, sin embargo también se ha informado sobre cierto grado de citotoxicidad en varios tipos de células. Es por lo tanto que en este trabajo se analizó el efecto citotóxico de estos dos antisépticos en células epiteliales humanas y de riñón de mono. De esta manera se puede comparar el efecto no solo benéfico sino también citotóxico con el fin de considerar su acción sobre todo en uso prolongado por el ser humano y optar por el colutorio más seguro.

Material y Métodos

Cultivo celular

Los células epiteliales de riñón de mono verde africano (Cepas MA104 y Vero) y la línea celular epitelial humana HeLa fueron cultivadas en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 3 y 10 % de suero bovino fetal, respectivamente (FBS , BioWest , Nuaillé , Francia) a 37 ° C con 5% de CO₂ , en placas demicrotitulación de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific , MA , EE.UU.) brevemente se realiza un lavado con Edta 0.68 mM y después se agregó tripsina-Edta durante 5 minutos en la incubadora a 37 ° C con 5% de CO₂ posterior se realizó el conteo de celulares con un Hematocinometro para calcular 1×10^5 en placas de 96 para obtener una mono capa confluyente aproximadamente 48 horas, se fue corroborado con microscopio invertido modelo Motic AE31.



Figura 2. Líneas celulares de crecimiento y condiciones de crecimiento.

Efecto de la Octenidina sobre células epiteliales humanas por ensayo del MTT

Se estudió la posible citotoxicidad de OCT contra los cultivos de células MA104 y HeLa utilizando el ensayo (Biotium, Hayward, CA) (Mosmann, 1983; Liu y cols, 1997) de la viabilidad celular MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio]. Las Células 1×10^5

se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche con 0,5, 0,25 y 0,0125% de OCT (Schülke y Mayr GmbH, Norderstedt, Alemania) y 0,06 y 0,03% de clorhexidina (productos Ultradent, South Jordan, UT) como control positivo y células libres de drogas con medio de cultivo solo como células no tratadas. Después de la incubación, se añadieron 10 µl de MTT a cada pocillo y se incubó a 37 ° C y 5% de CO₂ por 2 horas en condiciones de oscuridad. Después de lo cual, el medio se retiró y 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) se añadió para disolver el producto formazan MTT reducido. El MTT reducido fue después ensayado a 595 nm usando un lector de microplaca de absorbencia (Biotek, Winooski, VT) y el DMSO se empleó como blanco. El ensayo se realizó por triplicado y la densidad óptica medida se analizó adicionalmente por las estadísticas descriptivas. En algunos casos se siguió el método descrito anteriormente, pero el efecto de OCT en las células epiteliales fue observado a 5, 15, 30 y 60 minutos.

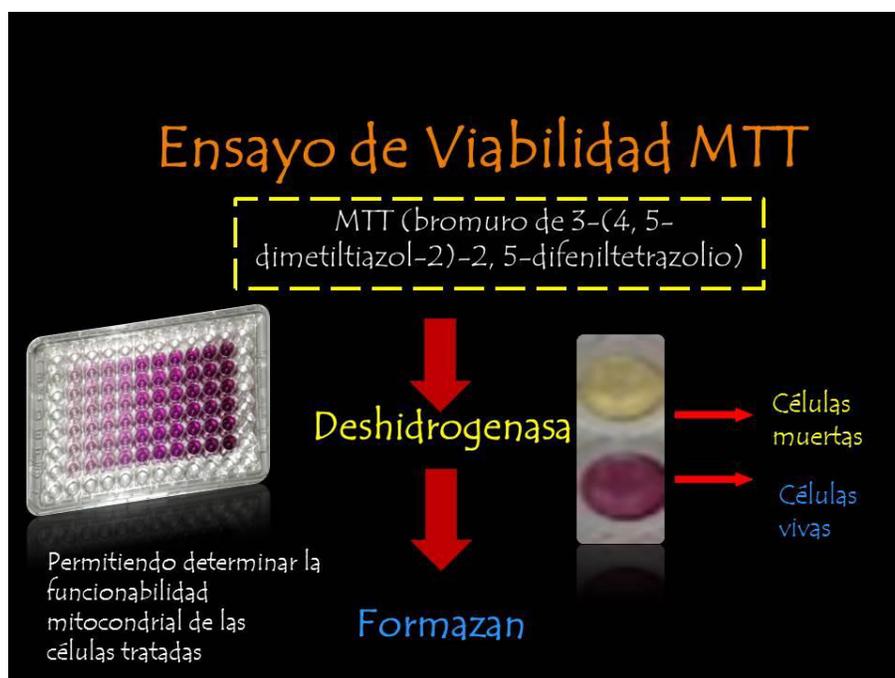


Figura 2.1 Fundamento del Ensayo de viabilidad MTT.



Figura 2..2 Efecto de la Octenidina sobre células epiteliales mediante el ensayo de viabilidad MTT.

Influencia de clorhidrato de Octenidina en las células MA104 y HeLa por microscopía de fluorescencia.

Basado en el protocolo descrito anteriormente, la influencia de clorhidrato de Octenidina en Células MA104 y HeLa se evaluó por microscopía de fluorescencia. Después del tratamiento con 0.05 , 0.025 , 0.0125 % de OCT o 0,06 % de clorhexidina (productos Ultradent , South Jordan , UT) por más de 24 horas , las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con Calceína AM (Biotium , Hayward, CA) (Bozyczko-Coyne y cols, 1993; Akesson, 1993. Los núcleos de las células epiteliales se tiñeron con 4 ', 6 - diamidino-2 - fenilindol (DAPI) (AbcamInc , Cambridge , UK). La citotoxicidad y la integridad de la membrana celular se interpretó sin Calceína AM retenida en el interior de las células y por la presencia de núcleo degradado o amorfo, con filtros de FITC y DAPI a 485 nmy 358 nm respectivamente (Thornwood , NY).

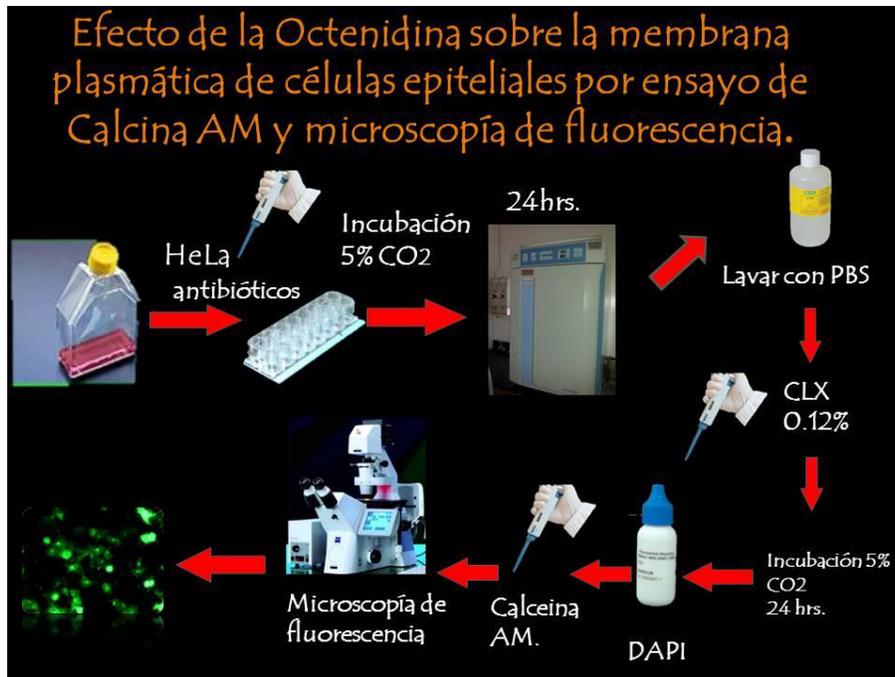


Figura 2.3. Ensayo de Calceína AM y microscopía de fluorescencia

Impacto de Octenidina en el ADN genómico de las células epiteliales de Ensayo Cometa

Para determinar el posible daño en el ADN genómico de las células MA104 y HeLa después de exposición a OCT, fue empleado el ensayo cometa OxiSelect (CellBiolabs, Inc, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor (Osting, 1984; De Boeck, 2000). A continuación, las células MA014 y HeLa se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche con 0.05% de OCT o 0,06% de clorhexidina (Productos Ultradent, South Jordan, UT) como control positivo y células de libres de drogas con medio de cultivo solo como células no tratadas. Después de la incubación, las células se recogieron por centrifugación a 700xg durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células se lavaron con PBS y se combinaron con cometa agarosa a una relación de 01:10 y se entubaron 75 uL / pocillo en el OxiSelect Deslice Comet. El portaobjetos se mantuvo en posición horizontal y se transfirió a 4 °C en la oscuridad durante 15 minutos. Con cuidado, el portaobjetos se transfirió a un recipiente con buffer lisis (25mL / portamuestras) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. El buffer de lisis fue reemplazado con una solución alcalina (25 mL /

portamuestras) y se incubó de nuevo durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. El portaobjetos se transfirió a una cámara de electroforesis horizontal aplicando un ajuste de corriente de 300 mA durante 30 minutos. Después de eso, el portaobjetos se lavó con agua estéril milliQ y el agua se reemplazó con etanol frío al 70% durante 5 minutos. El etanol se eliminó y el portamuestras dejó secar al aire. Una vez que la agarosa y portamuestras estuvieron completamente secas, se añadió 100 uL / pocillo de tinta diluida verde de ADN y se incubaron en la habitación de temperatura durante 15 minutos. Los portamuestras fueron vistos por microscopía epifluorescente utilizando un Filtro de FITC (Thornwood, NY).

Respuesta inflamatoria de las células epiteliales a octenidina

Con el fin de explorar si bajas concentraciones de OCT podrían promover una respuesta inflamatoria en las células epiteliales, el nivel de interleucina 6 (IL6) se midió por ensayo ELISA siguiendo las instrucciones del proveedor (Pierce Biotecnología, Rockford, Estados Unidos) (Soda y cols, 2003; Chung, 1996). Las densidades ópticas se determinaron usando un lector de absorbencia de micro-placa (Biorad, Philadelphia, PA) a 450 nm. Los experimentos se repitieron tres veces y la densidad óptica medida se analizó mediante estadística descriptiva.

Efecto apoptótico de OCT en células epiteliales

Para analizar si bajas concentraciones de OCT podrían conducir a la apoptosis después de la incubación con las células humanas, se empleó el kit de ensayo de apoptosis CF488A t / 7-AAD (Boersma y cols, 1996; Zelenin y cols, 1984) siguiendo las instrucciones del proveedor (Biotum, Hayward, CA), una monocapa confluyente de células HeLa crecido con 1×10^{-4} and 1×10^{-7} % de octenidina por 24 hrs fue recogido y se lavó con 1X de PBS. Después de eso, las células se volvieron a suspender con 1x binding buffer y alícuotas de 100 ul/tubo. 5 µl de CF488A-Anexina V y 2ul 7-AAD de solución de trabajo fueron añadidos a las células y se incubaron a temperatura

ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, 400 μ l de binding buffer se añadieron a cada tubo y las células se analizaron por el flujo de citometría a 488 nm en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BDBiosciences, San Jose CA ,EE.UU).

Resultados

Citotoxicidad de Octenidina sobre células epiteliales humanas

Con el fin de determinar la posible citotoxicidad de clorhidrato de Octenidina, células epiteliales humanas se expusieron a varias concentraciones de OCT (0,5, 0,25, y 0,0125%) durante 24 h. El número de células vivas después de la exposición fue determinado por el ensayo de viabilidad celular MTT y los resultados indican que sólo el 12% de las células estaban viviendo después del tratamiento de OCT en todas las concentraciones evaluadas (Figura 3). Resultados similares se encontraron con clorhexidina (a concentraciones más bajo de las que se emplean en los colutorios orales) ya que inhibió completamente el crecimiento celular (Figura 3), y se exhibe un alto efecto citotóxico sobre las células HeLa. Con la intención de descartar un fenómeno exclusivo de las células HeLa, células de riñón de mono (MA0149) fueron expuestas a las mismas concentraciones de OCT, obteniendo resultados idénticos rechazando un artificio metodológico. Para estar seguros de estos datos, se exploró la influencia de OCT en células epiteliales en tiempos cortos post-incubación (0, 5, 15, 30 y 60 min.). Usando concentraciones equivalentes de OCT y CHX, se obtuvieron los mismos resultados, el 88,5% del crecimiento celular fue inhibido desde los 5 minutos de exposición que permanece constante a lo largo de todo el tiempo (Figura 3.1). Una vez más nuestros resultados muestran un efecto tóxico evidente en presencia de OCT, lo que sugiere una rápida introducción a la célula diana, alterando su fisiología. Este fenómeno fue apoyado por la microscopía fluorescente empleando Calceína AM, el cual es retenido en el citoplasma de las células vivas. Como puede verse en la Figura 3.2, después de la incubación con OCT, el núcleo y, de hecho, toda la célula parecía estar intoxicado por OCT en todas las concentraciones estudiadas. Se observaron resultados idénticos cuando se agregó clorhexidina a las culturas HeLa, lo que sugiere que tanto OCT como clorhexidina alteran la permeabilidad de la membrana permitiendo la salida de Calceína AM.

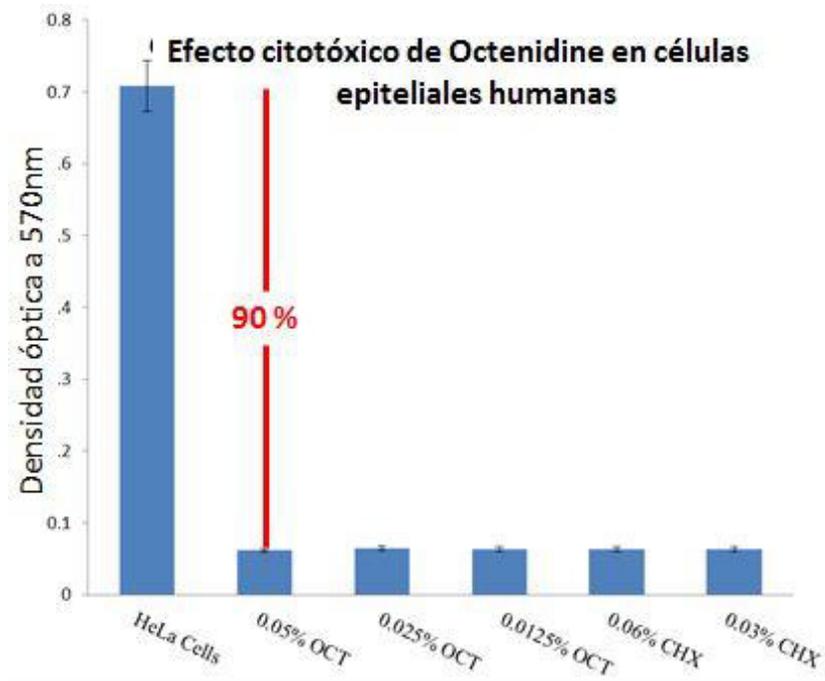


Figura 3. Efecto de Octenidina sobre las células epiteliales humanas. Células HeLa fueron tratados con diferentes concentraciones de octenidina durante 24 h. y el número de células vivas era determinada por ensayo de viabilidad MTT. La clorhexidina se utilizó como control positivo de la toxicidad. Las densidades ópticas obtenidas por triplicado se midieron a 570nm utilizando un lector de absorbencia de microplaca. Los experimentos se repitieron tres veces para asegurar la veracidad de resultados.

Efecto citotóxico de Octinidina a diferentes tiempos en células epitelial

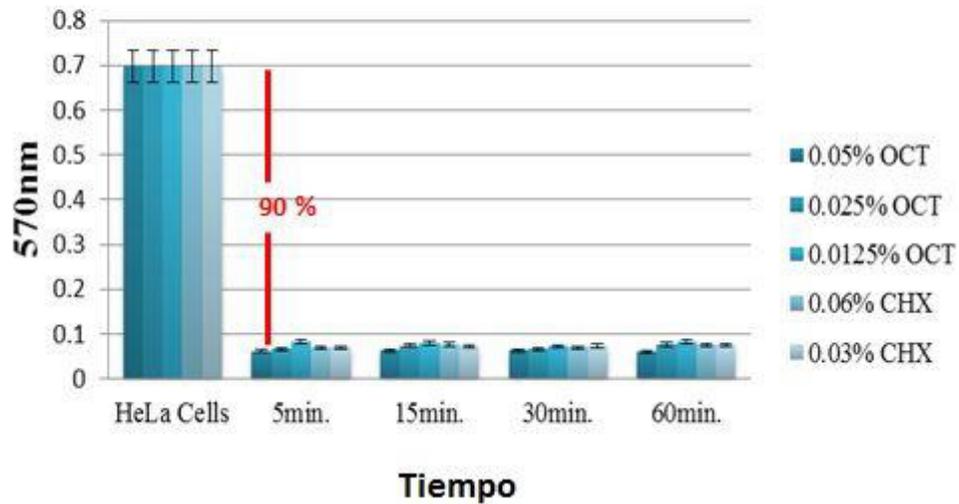


Figura 3.1 Tiempo - efecto de Octenidina sobre las células epiteliales humanas. Células HeLa fueron tratados con diferentes concentraciones de octenidina para 5 , 15 , 30 y 60 minutos y el número de las células vivas se determinó mediante ensayo de viabilidad MTT . La clorhexidina se utilizó como control positivo de la toxicidad. Las densidades ópticas obtenidas por triplicado se midieron a 570 nm usando un lector de absorbencia de microplaca. Los experimentos se repitieron tres veces para asegurar la veracidad de los resultados.

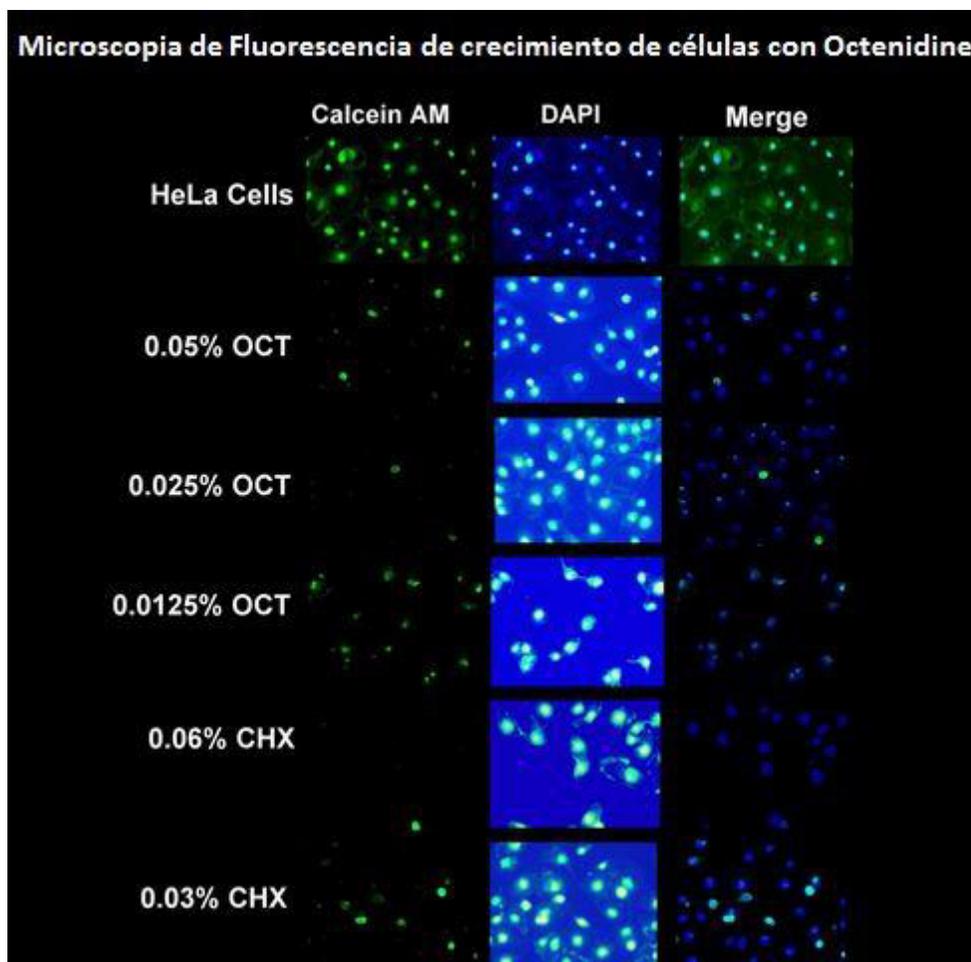


Figura 3.2 Citotoxicidad de Octenidina en células epiteliales humanas por microscopía de fluorescencia. Células HeLa fueron tratados con las técnicas descritas anteriormente. Después de 24 horas de incubación las células epiteliales se tiñeron con Calceína AM , el núcleo con DAPI y se observó bajo microscopía de fluorescencia a 485 y 358 nm (Thornwood , NY). Las imágenes se analizaron mediante el uso de software AxioVision (Thornwood, NY). La barra indica 5µm.

Efecto de Octenidina en el ADN genómico de las células epiteliales

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la OCT en las células humanas, ensayos de genotoxicidad se llevaron a cabo para determinar una posible lesión en el ADN de las células epiteliales expuestas a OCT. Después de 24 horas de incubación con 0,05% OCT, el ADN de las células fue analizado por el ensayo cometa y microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron una cola después de la Tinción de ADN (señal

de células apoptóticas), lo que indica que la OCT afecta el ADN genómico de células HeLa (Figura 3.3). 0,06% de clorhexidina produjo la señal clásica de los daños en el ADN genómico, como se esperaba (Figura 3.3). Estos resultados indican que OCT exhibe alta toxicidad en el ADN genómico de las células epiteliales en el mismo nivel de clorhexidina bajo nuestras condiciones experimentales.



Figura 3.3. Genotoxicidad de Octenidina sobre células epiteliales humanas mediante el ensayo cometa y microscopía de fluorescencia. Células HeLa cultivadas en medios de cultivo se usaron como control positivo. El efecto de 0,05 % y 0,06 % de octenidina y clorhexidina sobre células HeLa se analizó después de 18 hrs. de incubación por microscopía de fluorescencia a 485 nm (Thornwood, NY). La presencia de una estela es indicativo de daño en el ADN.

Respuesta inflamatoria de las células epiteliales a Octenidina

Con el fin de explorar si las bajas concentraciones de OCT podrían promover un respuesta inflamatoria en las células epiteliales, el nivel de IL6 se determinó mediante ensayo ELISA. La Figura 3.4 muestra un claro aumento en el nivel de IL6 cuando las células HeLa crecen en presencia de 1×10^{-3} de OCT cuando se compara con las células HeLa. El nivel de IL-6 se elevó un 43,7% en la presencia

de OCT. En contraste, cuando concentraciones altas (1×10^{-2} o más) de OCT eran añadido a células de cultivo, no había células vivas para desarrollar una respuesta inflamatoria.

Se obtuvieron los mismos resultados cuando se utilizó 1% de peróxido de hidrógeno en lugar de OCT. 1×10^{-4} de OCT exhibieron un comportamiento similar al de las células HeLa. Estos datos sugieren que bajas concentraciones de OCT estimulan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias de las células huésped.

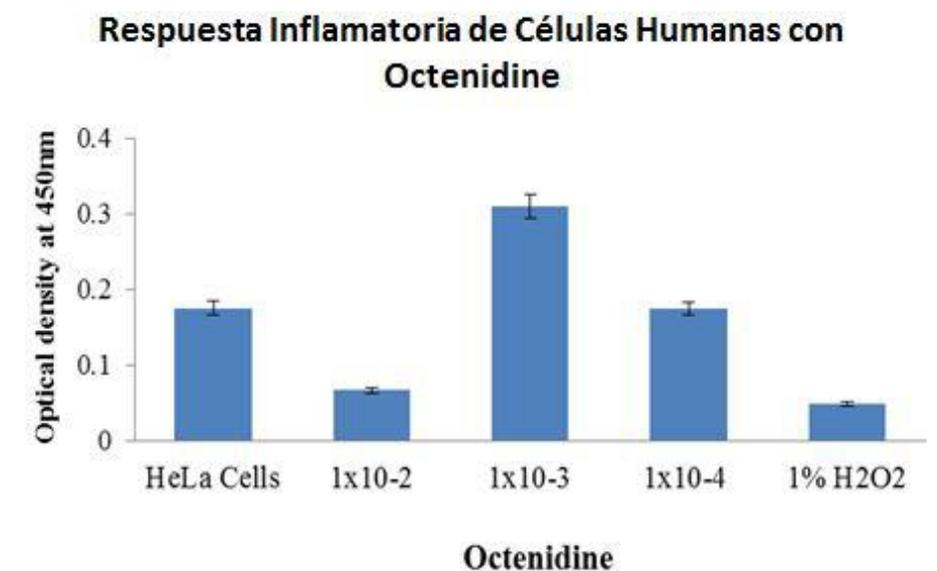


Figura 3.4 Respuesta inflamatoria de las células humanas Octenidina. El cultivo de Células HeLa se utilizó como control positivo. La capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria de 0,01 , 0,001 y 0,0001 % de octenidina y 1 % de peróxido de hidrógeno de las células HeLa se analizó midiendo el nivel de IL6 mediante el ensayo ELISA y la medición de densidades ópticas en un lector de microplaca de absorbencia a 450 nm. El promedio de tres experimentos fueron analizados para la seguridad de la veracidad de los resultados.

Efecto apoptótico de OCT en las células epiteliales humanas

Sobre la base de últimos experimentos, se exploró si las bajas concentraciones de OCT podrían conducir a la apoptosis de las células huésped utilizando el / kit

CFTM488A /7-AAD de ensayo de apoptosis y el flujo de citometría. Los resultados indican que la baja concentración de OCT no promovió apoptosis entre las células epiteliales humanas (Figura 3.5). No había diferencia entre 1×10^{-3} de OCT y el grupo de control (células en crecimiento sólo con medios de cultivo) que muestran similares medias de las células vivas después de 24 horas de crecimiento. Estos resultados sugieren que altas concentraciones de OCT inhiben el crecimiento de células humanas mediante la alteración de las funciones básicas de host células y cantidades inferiores de OCT no son perjudiciales para las células humanas.

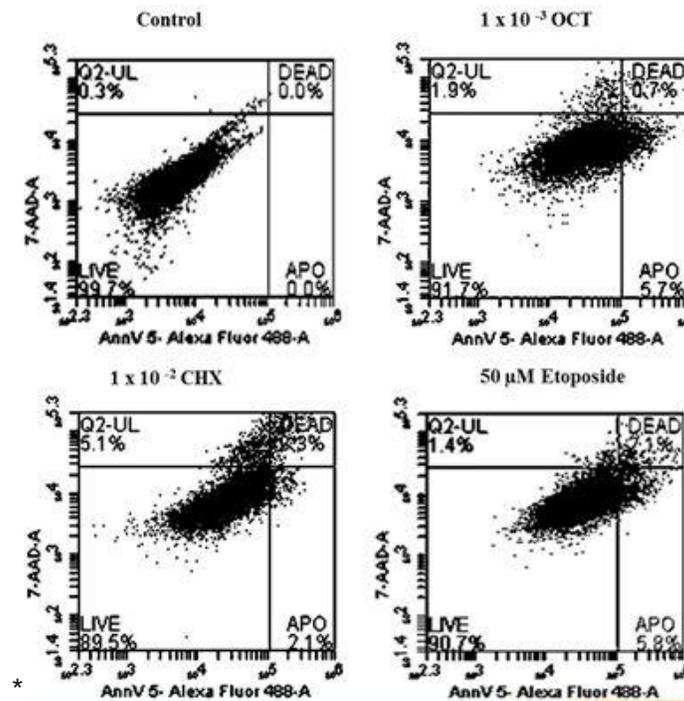


Figura 3.5 Efecto apoptótico de bajas concentraciones de Octenidina sobre células humanas. La posible conducción a la apoptosis de la célula huésped por 1×10^{-3} de octenidina fue explorada por Anexina V y el ensayo de 7 -AAD usando citometría de flujo a 488 nm.

Discusión

Está bien establecido el papel de la placa dental como la causa etiológica de la caries, la gingivitis y la enfermedad periodontal (Costerton, 1995; Loe y cols, 1965; cols, 1978). El control de placa mecánico se ha convertido en la piedra angular del tratamiento dental, sin embargo, la prevalencia casi omnipresente de la caries y la gingivitis hace sugerir que el control de biopelícula dental a través de medios mecánicos es ineficiente. A pesar de que muchos productos se han utilizado para controlar la placa y la gingivitis, incluyendo peróxido de hidrógeno (Hossainian y cols, 2011), hexetidina (Afennich y cols, 2011), cloruro de cetylpyrinidum (Haps y cols, 2008), aceites esenciales (Stoeken y cols, 2007), etc., la clorhexidina es uno de los antisépticos más utilizados e investigados (Van Stydonck y cols, 2012). Sin embargo, el efecto biocida de la clorhexidina no es exclusivo para los microorganismos patógenos. Varios informes indican un efecto citotóxico importante en una variedad de células de mamíferos (Louis, 1985; Kenney y cols, 1972; Knuutila, 1981; Heleland y cols, 1971; Pucher, 1992; Silvestri, 2013). Sobre la base de estos informes, otras moléculas atrajeron el interés para ser utilizadas como enjuagues orales.

Clorhidrato de octenidina al 0.1% ha sido utilizado como antiséptico bucal principalmente en Países europeos. OCT se desarrolló en el Instituto de Investigación SterlingWinthop como potencial agente antimicrobiano tópico. Últimamente este compuesto se encontró que era eficaz en la inhibición de crecimiento de bacterias formadoras de placa (Bailey y cols, 1984) y en una reducción del desarrollo de placa en animales de experimentación (Emilson y cols, 1991). Uno de los estudios recientes mostraron que un 0,1% enjuague bucal octenidina proporcionado reducciones estadísticamente significativas de 39% menos de la placa, 50% menos de gingivitis y 60% menos sitios gingivales sangrado (Beiswanger y cols, 2009). A pesar de que es ampliamente utilizado, no hay informes sobre un posible efecto tóxico de octubre en las células humanas.

En este trabajo se investigó la influencia de clorhidrato octenidina en células epiteliales humanas. Los resultados obtenidos mostraron una alta toxicidad, tanto para OCT como para clorhexidina a concentraciones finales analizados y desde los 5 minutos de

exposición (Figuras 5 y 6). Para descartar un fenómeno exclusivo para las células HeLa, otras células epiteliales (células de riñón de mono, MA014) se utilizaron para analizar el efecto de OCT, la obtención de resultados fue idéntico (datos no mostrados). Para confirmar los resultados anteriores, se siguió un procedimiento similar, pero la observando la morfología de las células cultivadas con OCT y clorhexidina. Las imágenes de la Figura 3.2 apoyan los datos descritos mostrando previamente células sin membrana integral y núcleo deformado.

Kocak y cols en el 2009 reportó que el 0,0001% de OCT mata mas todos los *Streptococcus mutans* después de sólo 1-10 minutos de exposición, este dato coincide con nuestros resultados en células epiteliales humanas lo que sugiere que la actividad biocida de OCT no está restringido contra los microbios patógenos como la clorhexidina lo hace.

Con el fin de caracterizar la influencia tóxica de OCT en las células humanas, ensayos de genotoxicidad se llevaron a cabo para determinar una posible lesión en el ADN de las células epiteliales expuestas 24 horas a Clorhidrato octenidina. Después de 24 hrs. de exposición a OCT el ADN genómico presentó una cola típica cuando se observó por microscopía de fluorescencia, sugiriendo ADN dañado. En comparación con las células en crecimiento con clorhexidina, mostraron una cola mayor corroborando los informes previos de genotoxicidad de clorhexidina (Mariotti, 1999). Anteriormente, ha sido informado de que la clorhexidina presenta una mala absorción por los tejidos (Rushton, 1977), ¹²⁰ sin embargo en este experimento que emplea cultivos de células de riñón de mono clorhexidina fue extremadamente tóxico después de unos minutos de exposición, lo que sugiere una rápida absorción a través de la membrana plasmática.

Cuando se estudió la respuesta inflamatoria, los datos de este trabajo sugieren que las bajas concentraciones de octenidina estimulan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias de las células huésped. Como toda molécula extraña, octenidina causan una respuesta del sistema inmune de las células HeLa. Se ha propuesto que un aumento en el nivel de citoquinas pro-inflamatorias podría culminar con la activación de

vías de la apoptosis, la destrucción de las células huésped (Haanen, 1995).¹²¹ Sin embargo, cuando Anexina V se utiliza para etiquetar las células apoptóticas, muy pocos de ellos estaban en estado apoptótico y no se detectaron diferencias entre las células que crecen con los medios de cultivo. Estos resultados sugieren que altas concentraciones de OCT inhiben el crecimiento de células humanas y puede ser debido a alteración de las funciones básicas de las células huésped; cantidades inferiores de OCT no son perjudiciales para las células humanas.

No se sabe cómo OCT causan el efecto tóxico sobre las células epiteliales. El producto comercial (Octenidol; Shülke y Mayr GmbH, Norderstedt, Alemania) presenta un pH de 4, pero se ignora si la citotoxicidad encontrado en este trabajo podría atribuirse a su bajo pH. Basado en experimentos con Calceína AM, se sugiere un fuerte daño en la membrana plasmática, alterando su permeabilidad con una lesión subsecuente en el ADN debido a OCT interiorizado.

Se necesitan experimentos para explicar con detalle todas las interacciones bioquímicas de OCT con moléculas celulares.

Conclusiones

En este estudio se muestra que OCT al 0.1% y la CHX al 0.12% presentaron una elevada toxicidad en células epiteliales humanas lo que sugiere que su uso a largo plazo podría ser perjudicial para las personas. Por lo tanto, el efecto beneficioso así como posibles efectos nocivos de octenidina en los seres humanos deben ser sopesados en otros estudios *In vivo*.

Literatura citada

Addy M, Moran JM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine-formulations. *Periodontol* 2000 1997; 15:52-4.

Adams, D, Quayum, M, Worthington, T, Lambert, P, Elliott, T. Evaluation of a 2% chlorhexidine gluconate in 70% isopropyl alcohol skin disinfectant *Journal of Hospital Infection* , 2005: 61 , 4 , 287 - 290

Afennich F, Slot DE, Hossainian N, Van der Weijden GA. The effect of hexetidine mouthwash on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *International journal of dental hygiene*. 2011;9(3):182-90. Epub 2011/03/02.

Akeson AL, Woods CW. A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *Journal of immunological methods*. 1993;163(2):181-5. Epub 1993/08/09.

Al-Doori Z, Goroncy-Bermes P, Gemmell CG, Morrison D. 2007. Low-level exposure of MRSA to octenidine dihydrochloride does not select for resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:1280–1281.

Arévalo JM, Arribas JL, Calbo L, Hernández Ma J, Lizán M, Herruzo R. Guía del grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos. Revisión 1998. *Medicina Preventiva* 1998; 4(2): 38 – 43

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007;52:S64-S82.

Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Diseases*. 2003, 9 Suppl 1:23–9.

Bailey DM, De Grazia CG, Hoff SJ. Bispyridinamines: a new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque. *J MedChem.* 1984; 27:1457–1464.

Bascones A, Manso FJ. Clorhexidina en odontoestomatología: conceptos actuales y revisión de la literatura. *Avances en odontoestomatología* 1994 Diciembre 10(10):685-708.

Basrani B, Lemonie C. Chlorhexidine gluconate. *Aust Endod J* 2005; 31:48-52.

Beals D, Ngo T, Feng Y, et al. Development and laboratory evaluation of a new tooth brush with a novel brush head design. *Am J Dent* 200, 13:5A–14

Beiswanger BB, Mallatt ME, Jackson RD, Hennon DK. The clinical effects of a mouthrinse containing 0.1% octenidine. *J Dent Res* 1990; 69:454-457.

Brading MG, Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *International Dental Journal*. 2003, 53:353-62.

Brill F, Goroncy-Bermes P, Sand W. 2006. Influence of growth media on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to cationic biocides. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 209:89-95.

Boersma AW, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures -treated with cisplatin. *Cytometry*. 1996;24(2):123-30E.

Bozyczko-Coyne D, McKenna BW, Connors TJ, Neff NT. A rapid fluorometric assay to measure neuronal survival in vitro. *Journal of neuroscience methods*. 1993;50(2):205-16.

Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig* 2007; 11:155-164.

Case DE. Safety of Hibitane. I. Laboratory experiments. *J Clin Periodontol*. 1977; 4: 66-72.

Carretero-Peláez M^a A, Esparza-Gómez GC, Figuero-Ruiz E, Cerero-Lapiedra R. Alcohol containing mouthwashes and oral cancer Critical analysis of literature. *Med Oral*. 2004;9:116- 23.

Chainani SH, Siddana S, Reddy C, Manjunathappa TH, Manjunath M, Rudraswamy S. Anti plaque and anti gingivitis efficacy of triphala and chlorhexidine mouthrinse among school children - a cross-over, double-blind, randomised controlled trial. *Oral health & preventive dentistry*. 2014;12(3):209-17.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92:446-450.

Clark DC, Morgan J, MacEntee MI. Effects of a 1% chlorhexidine gel on the cariogenic bacteria in high-risk elders: a pilot study. *Spec Care Dentist* 1991,11:101-103.

Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2003;83(4):222-6. Epub 2003/07/29.

Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology*. 1995;15(3):137-40. Epub 1995/09/01.

Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005, 99:768-772.

De Boeck M, Touil N, De Visscher G, Vande PA, Kirsch-Volders M. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation research*. 2000;469(2):181-97. Epub 2000/09/14

Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brex M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *European journal of oral sciences*. 2003;111(2):144-8. Epub 2003/03/22

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; 53:518-523.

Dogan AA, Adiloglu AK, Onal S, Cetin ES, Polat E, Uskun E, Koksal F. Short-term relative antibacterial effect of octenidine dihydrochloride on the oral microflora in orthodontically treated patients. *Int J Infect Dis* 2008; 12:e19-25.

Emilson CG, Bowen WH, Robrish SA, Kemp CW: Effect of the antibacterial agents octenidine and chlorhexidine on the plaque flora in primates. *Scand J Dent Res* 1981, 89:384-392.

Enrile de Rojas FJ, Alemany AS, Burguera AC, Dios PD. Aplicaciones clínicas adicionales de colutorios antisépticos. *Periodoncia* 2006, 16:95-104.

Epstein JB, McBride BC, Stevenson-Moore P, Merilees H, Spinelli J. The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in patients treated with radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:72-78.

Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod* 2004; 30:84-87.

Eren K, Ozmeriç N, Sardaş S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clin Oral Investig* 2002; 6: 150-154.

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, 27:452-455.

Fardal O y Turnbull R. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *JADA* 1986; 112: 863-9.

Fardal O, Tunrball RS. A review of the literatura on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal of American Dental Association* 1985;112:863-9

Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. *J Endod.* 2007; 33(6):715-22.

Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod* 2002; 28:68-71.

Fitzgerald KA, Davis A, Russell AD. Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate to *E. coli* and *P. aeruginosa* and its release by azolectin. *FEMS Microbiol Lett* 1989;60:327-32.

Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2008, Jan-Mar; 19:29-35.

Fujita S et al. Two cases of anaphylactic shock induced by chlorhexidine. *Masui* 1997 August; 46(8):118-121.

Gelinas P, Goulet J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. *J Appl Bacteriol* 1983; 54:243-247.

Ghannoum MA, Elteen KA, Stretton RJ, Whittaker PA. Effects of octenidine and pirtenidine on adhesion of candida species to human buccal epithelial cells in vitro. *Arch Oral Biol* 1990; 35:249-253.

Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In vitro* 2008; 22:308-317.

Grupo Nacional para el estudio y asesoramiento en úlceras por presión y heridas crónicas. Recomendaciones sobre la utilización de antisépticos en el cuidado de heridas crónicas. 2002.

Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 1986, 57:370-377.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34:424-428.

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. 2003;36:267-75.

Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi V de P, Zaia AA, Ferraz CC, et al.. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005, 100:512-517.

Gongwer LE, Hubben K, Lenkiewicz RS, et al. The effects of daily bathing of cleanser containing chlorhexidine gluconate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;52:255-61

Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators of Inflammation*. 1995;4(1):5-15.

Harke HP: [Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1989, 188:188-193.

Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *International journal of dental hygiene*. 2008;6(4):290-303.

Helgeland K, Heyden G, Rolla G. Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. *Scandinavian journal of dental research*. 1971;79(3):209-15. Epub 1971/01/01.

Herrera D: Chlorhexidine mouthwash reduces plaque and gingivitis. *Evid Based Dent* 2013, 14(1):17–18.

Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2001; 15(4-5):271-6.

Hiom SJ, Furr JR, Russell AD, et al. Effects of chlorhexidine diacetate on *C. albicans*, *C. glabrata* and *S. cerevisiae*. *J Appl Bacteriol* 1992;72:335-40

Hossainian N, Slot DE, Afennich F, Van der Weijden GA. The effects of hydrogen peroxide mouthwashes on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *International journal of dental hygiene*. 2011;9(3):171-81..

Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994, 20:276-278.

Jenull S, Hojdar K, Laggner H, Velimirov B, Zemann N, Huettinger M. Cellgrowth and migration under octenidine-antiseptic treatment. J Wound Care. 2015 Jun;24(6):280, 282-4, 286-8. doi: 10.12968/jowc.2015.24.6.280.

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology* 2000. 1997;15:55-62. Epub 1998/06/27.

Klimm W et al. Toxicity of different endodontic antiseptics. *Estomatologic DDR* 1989; 39:153-5.

Knuutila M, Soderling E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta odontologica Scandinavica*. 1981;39(5):285-9.

Kramer A, Adrian V, Adam C. Comparison of the toxicity of lavasept and selected antiseptic agents. *Hyg. Med* 1993, 18:9–16.

Kramer A, Mueller G, Reichwagen S, Widulle H, Heldt P, Nuernberg W: *Octenidine, Chlorhexidine, Iodine and Iodophores*. Stuttgart, New York: Georg Thieme; 2008.

Kenney EB, Saxe SR, Bowles RD. Effect of chlorhexidine on human polymorphonuclear leucocytes. *Archives of oral biology*. 1972;17(11):1633-6. Epub 1972/11/01.

Kocak MM, Ozcan S, Kocak S, Topuz O, Erten H. Comparison of the efficacy of three different mouthrinsesolutions in decreasing the level of streptococcus mutans in saliva. *Eur J Dent* 2009; 3:57-61.

Kubista M, Akerman B, Norden B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*. 1987;26(14):4545-53. Epub 1987/07/14.

Larson E, Leyden JJ, Mc Ginley KJ, et al. Physiologic and microbiologic changes in skin related to frequent hand washing. *Infect Control* 1986; 7:59-63

Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J* 2010; 43:430-435.

Lessa F, Campos R, Aranha Andreza Maria Fabio, Nogueira Indri, Giro Elisa Maria Aparecida, Hebling Josimeri, Costa Carlos Alberto de Souza. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J. Appl. Oral Sci.* 2010 Feb,18(1): 50-58..

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999, 25:167-171.

Litter, M. *Farmacología: Experimental y clinica* 7ma Edición. Editorial El Ateneo. Argentina 1986 p. 1405 y p. 1421-2.

Lindhe J, Hamp SE, Loe H, Schiott CR. Influence of topical application of chlorhexidine on chronic gingivitis and gingival wound healing in the dog. *Scand J Dent Res* 1970;78:471-478.

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*. 1997;69(2):581-93. Epub 1997/08/01.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *Journal of periodontology*. 1965;36:177-87.

Loe H, Anerud A, Boysen H, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. Study design and baseline data. *Journal of periodontal research*. 1978;13(6):550-62.

Louis SM, Pearson RM. A comparison of the effects of nonoxynol-9 and chlorhexidine on sperm motility. *Contraception*. 1985;32(2):199-205. Epub 1985/08/01.

Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *Journal of periodontology*. 1999;70(12):1443-8. Epub 2000/01/13.

Marshall DA, Eaglestein WH. Occlusive wound dressings to prevent bacterial invasion and wound infection. *J Am Acad Dermatol* 1985;12:662-8

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999, 12:147-79

Micromedex Inc. Drug evaluation monographs: chlorhexidine. Información proporcionada por el Departamento de Información científica del Laboratorio Abbee Bristol-Myers Squibb. 1998.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.

Müller G¹, Kramer A.J Antimicrob Chemother. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. 2008 Jun;61(6):1281-7.

Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003, 36:423-432.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1984;123(1):291-8. Epub 1984/08/30

O'Neill J, Hosmar M, Challop R, et al. Percutaneous absorption potential of chlorhexidine in neonates. *Curr Ther Res* 1982; 32:485

Patters et al. Effects of octenidine mouthrinse on plaque formation and gingivitis in humans. *J Periodontal Res* 21: 154-62 (1986)

Patters MR, Anerud K, Trummel CL, Kornman KS, Nalbandian J, Robertson PB. Inhibition of plaque formation in humans by octenidine mouthrinse. *Journal of periodontal research*. 1983;18(2):212-9.

Peyyala R, Ebersole JL: Multispecies biofilms and host responses: "discriminating the trees from the forest". *Cytokine* 2013, 61(1):15–25.

Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55:95-100.

Pitten FA, Werner HP, Kramer A: A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Infect* 2003, 55:108-115.

Pizzo G, Guiglia R, Imburgia M, Pizzo I, D'Angelo M, Giuliana G. The Effects of Antimicrobial Sprays and Mouth rinses on Supragingival Plaque Regrowth: A Comparative Study. *J Periodontol* 2006; 77,248-256.

Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *Journal of periodontology*. 1992;63(6):526-32. Epub 1992/06/01.

Rosenberg A, Alatary SD, Peterson AF. Safety and efficacy of the antiseptic chlorhexidine gluconate. *Surg Gynecol Obstet* 1976;143:789-92

Rushton A. Safety of Hibitane. II. Human experience. *Journal of clinical periodontology*. 1977;4(5):73-9.

Scheie AA, Petersen, FC. Antimicrobials in caries control. In: Fejerskov O, Kidd, E., editors. *Dental Caries. The Disease and its Clinical Management*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008. p.265-77.

Schiott CR, Løe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouth rinses on the human oral flora. *J Periodontal Res*. 1970;5(2):84-9.

Sedlock DM, Bailey DM. Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:786-790.

Senior N. Some observations on the formulation and properties of chlorhexidine. *J Soc Cosmet Chem* 1973; 24:255-61.

Sharma NC, Qaqish JG, Galustians HJ, Cugini M, Thompson MC, Warren PR. Plaque removal efficacy and safety of the next generation of manual tooth brush with angled bristle technology: results from three comparative clinical studies. *Am J Dent* 2005; 18: 3-7.

Shern RJ, Little WA, Kennedy JB, Mirth DB: Effects of octenidine on dental plaque and gingivitis in monkeys. *J Periodontol* 1987, 58:628-633.

Shern RJ, Monell-Torrens E, Kingman A. Effect of two recently developed antiseptics on dental plaque and carries in rats. *Caries Res* 1985; 19:458-465.

Siqueira JF Jr, Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007, 104:122-130.

Siqueira JF Jr, da Silva CH, Cerqueira M das D, Lopes HP, de Uzeda M. Effectiveness of four chemical solutions in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones. *Endod Dent Traumatol* 1998, 14:124-126.

Silvestri DL, McEnery-Stonelake M. Chlorhexidine: uses and adverse reactions. *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug.* 2013;24(3):112-8. Epub 2013/05/15.

Slee AM, Cimijotti E, Rothstein S. The effect of daily treatments with an octenidine dentifrice formulation on gingival health in cynomolgus monkeys. *J Periodontal Res* 1985; 20:542-549.

Slee AM, O'Connor JR. In vitro antiplaque activity of octenidine dihydrochloride (WIN 41464-2) against preformed plaques of selected oral plaque-forming microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 23:379-384.

Soda K, Kano Y, Kawakami M, Konishi F. Excessive increase of serum interleukin 6 jeopardizes host defense against multi-bacterial infection. *Cytokine.* 2003;21(6):295-302.

Spitzbart H. Tolerance study on selected antiseptics using human vaginal membrane in vitro. *HygMed* 1994, 19: 603-07.

Stoeken JE, Paraskevas S, van der Weijden GA. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. *Journal of periodontology.* 2007;78(7):1218-28.

Tietz A, et al. Octenidine hydrochloride for the care of central venous catheter insertion sites in severely immune compromised patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2005, 26:703-707.

Torres Muñoz, Á. (2012). Evaluación antimicrobiana del agua ozonizada en saliva (Master dissertation), Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.

Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004, 97:79-84.

Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(11):1042-55.

Warren P, Thompson M, Cugini M. Plaque removal efficacy of a novel manual tooth brush with Micro Pulse bristles and an advanced split-head design. *J ClinDent* 2007; 18: 49-54.

Westcott WW, Martindale W. Martindale, The Extra Pharmacopoeia. Reynolds JEF (Editor). 29th ed London. The Pharmaceutical Press, 1989.

Wu CD, Savitt ED. Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol* 2000. 2002;28:91- 105.

Yankell S, Moreno O, Soffin A, Lowary R y Gold W. Effects of chlorhexidine and four antimicrobial compounds on plaque , gingivitis and staining in beagle dogs. *J Dent Res* 1982, 61:1089-93.

Yamakami K, Tsumori H, Sakurai Y, Shimizu Y, Nagatoshi K, Sonomoto K: Sustainable inhibition efficacy of liposome-encapsulated nisin on insoluble glucan-biofilm synthesis by streptococcus mutans. *Pharm Biol* 2012, 51(2):267–270.

Youngner JS. Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1954;85(2):202-5.

Zelenin AV, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, Kolesnikov VA, Nikitin SM, et al. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry*. 1984;5(4):348-54.

Apéndice

Anexo I

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología.

“Citotoxicidad y genotoxicidad del clorhidrato de octenidina sobre células humanas”

“Cytotoxicity and genotoxicity of octenidine hydrochloride on human cells”

Carlos Galván-Caudillo¹, René Hernández-Delgadillo², Gustavo Martínez-González², Claudio Cabral-Romero²,

1 Alumno de Maestría en Odontología Avanzada, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

2 Profesor investigador, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Monterrey, Nuevo León, México.

Resumen

El clorhidrato de octenidina se emplea como ingrediente principal de enjuagues bucales debido a sus propiedades bactericidas y antibiopelícula. Aunque la octenidina es ampliamente utilizada, no hay reportes previos que indiquen su posible efecto tóxico en los seres humanos. El objetivo de esta investigación fue analizar la citotoxicidad de la octenidina en las células epiteliales humanas (HeLa). Células HeLa fueron cultivadas y expuestas a varias concentraciones de octenidina y la viabilidad celular se midió mediante ensayos de MTT. Los resultados obtenidos mostraron que no había células vivas después de 24 hrs de incubación al ser tratadas con 0,0125 a 0,05% de octenidina. Sorprendentemente, las mismas concentraciones de octenidina tuvieron un efecto citotóxico en todas las células HeLa después de sólo 5 minutos de exposición. Estos datos fueron apoyados por la observación de las mismas cultivadas con octenidina mediante microscopía de fluorescencia, que indicaron el daño sobre la membrana plasmática, probablemente alterando su permeabilidad. Empleando ensayos de genotoxicidad, se encontró que la octenidina causa lesiones al ADN genómico. Las concentraciones más bajas de octenidina indujeron un aumento de los niveles de IL-6. Sin embargo, no promueve la apoptosis entre las células epiteliales. Como conclusión; la octenidina es altamente tóxico en las células humanas, por lo tanto los efectos benéficos y nocivos de la octenidina en los seres humanos deben ser valorados en estudios in vivo.

Palabras clave: Citotoxicidad, enjuague bucal, Octenidol, Clorhidrato de octenidina, efecto tóxico.

Abstract

Octenidine hydrochloride is employed as main ingredient of mouth washes based on its bactericidal and antibiofilm properties. Although octenidine is widely used, there are no reports studying its possible toxic effect on humans. The aim of this research was to analyze the cytotoxicity of octenidine on human epithelial cells (HeLa). HeLa cells were cultured and exposed to several concentrations of octenidine and cell viability was measured by MTT assays. The findings showed no living cells were detected after 24 hrs. of HeLa cells growing in presence of 0.0125-0.05% octenidine. Surprisingly, same concentrations of octenidine kill all HeLa cells after only 5 minutes of exposition. These data were supported by observing HeLa cells grown with octenidine by fluorescence microscopy, indicating damage in plasma membrane, probably altering their permeability. Employing genotoxicity assays, it was found that octenidine cause injury to genomic DNA when it was added to HeLa cells cultures. Lower concentrations of octenidine induced an increasing of levels of IL6 in HeLa cells, however did not promote apoptosis among epithelial cells. As conclusion octenidine cause high toxicity on human cells, therefore beneficial and potential harmful effects of octenidine on humans must be weighed in further studies in vivo.

Keywords: Cytotoxicity, Mouth washes, Octenidol, Octenidine Hydrochloride, Toxic effect.

Introducción

La mayoría de colutorios orales tienen como ingrediente activo a la clorhexidina, una biguanida clorofenil^{1,2}. Esta posee una importante acción bactericida de amplio espectro y ha sido uno de los agentes más investigados en odontología. Desde 1960, la clorhexidina se ha utilizado para control de placa dental en base al primer informe realizado por Schroeder³. Aunque a varias concentraciones de clorhexidina se puede utilizar para matar las bacterias orales, se recomiendan enjuagues diarios de clorhexidina al 0.12% para mantener la salud bucal⁴. Sin embargo, el potente efecto biocida de la clorhexidina no es exclusivo para los microorganismos. Son Varios los reportes que sugieren un importante efecto citotóxico sobre una variedad de células de mamífero⁵⁻⁹. Basándose en estos informes, otras moléculas atrajeron el interés para ser utilizado como colutorios orales. El Clorhidrato de octenidina (OCT) es un derivado de bispiridina, por ejemplo: NN'-[110-decanedioyl-1(4)-piridinil-4-iliden] de dihidrocloruro (1-octanamine). Un enjuague bucal que contiene 0,1% de OCT es eficaz para reducir la acumulación de placa y la gingivitis¹⁰. La eficacia del OCT como enjuague bucal se demostró previamente en ratas y seres humanos¹¹. Se ha demostrado que el OCT parece ser más eficaz que la clorhexidina como un medio para la actividad anti-adhesiva bacteriana prolongada¹². También, el OCT ha sido sugerido como un irrigante endodóntico en base a sus propiedades antimicrobianas y su baja citotoxicidad¹³. Aunque las propiedades antimicrobianas del OCT son incuestionables, la citotoxicidad no se ha explorado ampliamente.

En este trabajo se analizó el efecto del OCT en las células epiteliales humanas. Los resultados obtenidos mostraron una alta citotoxicidad del OCT tanto en células de riñón de mono como también en las células epiteliales humanas. Los resultados obtenidos mostraron una alta citotoxicidad de OCT tanto en células de riñón de mono y células epiteliales humanas. La mayoría de las células murieron después de sólo 5 minutos de exposición a 0,0125% del OCT. Este dato fue corroborado por microscopía de fluorescencia observando la célula dañada después de la exposición temprana con OCT.

Material y métodos

Cultivo de células epiteliales humanas (HeLa) y de riñón de mono (MA-104)

Las células epiteliales de riñón de mono verde africano (MA104) y la línea celular humana HeLa se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 3 y 10% de suero bovino fetal, respectivamente (FBS, BioWest, Nuaille, Francia) a 37 ° C con 5% de CO₂, en placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) durante dos días hasta obtener una monocapa confluente ¹⁴.

Efecto del Clorhidrato de Octenidina en las células epiteliales por ensayo de viabilidad celular MTT

La posible citotoxicidad de OCT contra las MA104 y células HeLa se estudió utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro] (Biotium, Hayward, CA)^{15,16}. Se incubaron 1x10⁵ células a 37°C y 5% de CO₂ toda una noche con concentraciones de 0,5, 0,25 y 0,0125% de OCT (Schülke y Mayr GmbH, Norderstedt, Alemania) y 0,06 y 0,03% de clorhexidina (productos Ultradent, South Jordan, UT) como control positivo y células libres de drogas con medio de cultivo solo como células no tratadas. Después de la incubación, se añadieron 10 µl de MTT a cada pocillo y se incubaron a 37 ° C y 5% de CO₂ durante 2 horas en condiciones de oscuridad. Después de lo cual, se retiró el medio y se añadieron 100 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) para disolver el producto formazan MTT reducido. A continuación, el MTT reducido se ensayó a 570 nm usando un lector de microplacas absorbancia (Biotek, Winooski, VT) y DMSO fue empleado como blanco. El ensayo se realizó por triplicado y la densidad óptica medida se analizó mediante estadística descriptiva. En algunos casos, se sigue el procedimiento descrito anteriormente, pero el efecto del OCT en las células epiteliales fue observada a los 5, 15, 30 y 60 minutos.

Influencia del clorhidrato de Octenidine en células MA104 y HeLa por microscopía de fluorescencia

Basado en el protocolo descrito anteriormente, la influencia del clorhidrato de Octenidina en células MA104 y HeLa se evaluó por microscopía de fluorescencia. Después del tratamiento con 0,05, 0,025, 0,0125% de OCT y 0,06% de clorhexidina (productos Ultradent, South Jordan, UT) por más de 24 horas, las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con calceína AM (Biotium, Hayward, CA)^{17,18}. Los núcleos de las células epiteliales se tiñeron con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)¹⁹ (Abcam Inc, Cambridge, UK). La citotoxicidad y la integridad de la membrana celular se interpreta por no tener la capacidad de retención de la calceína AM en el interior de las células y por la presencia de núcleo degradado o amorfo, con filtros de FITC y DAPI en 485 nm y 358 nm respectivamente (Thornwood, NY).

Impacto de Octenidina en el ADN genómico de las células epiteliales mediante ensayo cometa

Para determinar los posibles daños en el ADN genómico de las células HeLa y MA104 después de la exposición del OCT, se empleó el ensayo de cometa Oxiselect (Cell Biolabs, Inc, CA, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor^{20,21}. Brevemente, las células MA014 y HeLa se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche con 0.05% de OCT y 0,06% de clorhexidina (productos Ultradent, South Jordan, UT) como control positivo y las células libres de drogas con medio de cultivo solo como células no tratadas. Después de la incubación, las células se recogieron por centrifugación a 700xg durante 2 minutos y desechar el sobrenadante. Las células se lavaron con PBS y se combinan con agarosa cometa a una relación de 01:10 y se pipetea 75 uL / pocillo en el portaobjetos OxiSelect Cometa OxiSelect. El portaobjetos se mantiene horizontalmente y se transfirió a 4 °C en la oscuridad durante 15 minutos. Con cuidado, el portaobjetos se transfiere a un recipiente con Buffer de lisis (25 ml / portaobjetos) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. El buffer de lisis se reemplazó con solución alcalina (25 mL / portaobjetos) y se incubó de nuevo durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. El portaobjetos se transfiere a una cámara de electroforesis horizontal aplicando un ajuste de corriente de 300 mA durante 30 minutos. Después de eso, el portaobjetos se lavó con agua destilada estéril y el agua se reemplazó con etanol frío al 70% durante 5 minutos. Se eliminó el etanol y el portaobjetos se dejó secar al aire. Una vez que la agarosa y el portaobjeto está completamente seco, se añadieron 100 uL de Vista Green dye por pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los portaobjetos se vieron por microscopía de epifluorescencia utilizando un filtro FITC.

La respuesta inflamatoria de las células epiteliales con Octenidina

Con el fin de explorar si las bajas concentraciones de octenidina podrían promover una respuesta inflamatoria de las células epiteliales, el nivel de la interleucina 6 (IL-6) se midió mediante el ensayo ELISA siguiendo las instrucciones del proveedor (Pierce Biotechnology, Rockford, EE.UU.)^{22,23}. Las densidades ópticas se determinaron usando un lector de absorbancia micro-placa (Biorad, Philadelphia, PA) a 450 nm. Los experimentos se repitieron tres veces y la densidad óptica medida se analizó mediante estadística descriptiva.

Efecto de apoptosis del clorhidrato de Octenidina en las células epiteliales

Para analizar si las bajas concentraciones de octenidina podrían conducir a la apoptosis después de la incubación con células humanas, se empleó el kit CF488A / 7AAD Ensayo de Apoptosis^{24,25}. Siguiendo las instrucciones del proveedor (Biotium, Hayward, CA), se cultivó una monocapa confluyente de células HeLa con 1×10^{-4} and 1×10^{-7} % de octenidina por 24 hrs. Después de eso, las células se resuspendieron con un tampon de buffer al 1x y alícuotas de 100 l / tubo de unión, se añadieron 5 µl de CF488A-Anexina V y 2 µl de solución de trabajo de 7-AAD a las células y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se añadieron 400 µl de tampón de buffer a cada tubo y las células se analizaron por citometría de flujo a 488 nm en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose CA, EE.UU.).

RESULTADOS

La citotoxicidad del clorhidrato de Octenidine en las células epiteliales humanas

Con el fin de determinar la posible citotoxicidad del clorhidrato de Octenidine, en células epiteliales humanas se expusieron a varias concentraciones de OCT (0,5, 0,25 y 0,0125%) durante 24 h. El número de células vivas después de la exposición se determinó mediante ensayo de viabilidad celular MTT y los resultados de indican que sólo el 12% de las células estaban vivas después del tratamiento con OCT en todas las concentraciones evaluadas (Figura 1). Un resultado similar se encontró con la clorhexidina (en las concentraciones más bajas que se emplea en los colutorios orales) inhibió completamente crecimiento el celular (Figura 1), que exhibe un alto efecto citotóxico sobre las células HeLa. Con la intención de descartar un fenómeno exclusivo para las células HeLa, las células de riñón de mono (MA014) fueron expuestos a mismas concentraciones de octenidina, obteniendo resultados idénticos rechazando un artificio metodológico.

Para estar seguro de estos datos, se investigó la influencia de octenidina en las células epiteliales a tiempos cortos después de la incubación (0, 5, 15, 30 y 60 min.). El uso de concentraciones equivalentes de OCT y clorhexidina, se obtuvieron los mismos resultados, 88,5% del crecimiento celular se inhibió desde 5 minutos de exposición que permanece constante a lo largo de todo el tiempo (Figura 2). Una vez más nuestros resultados muestran un efecto tóxico evidente en presencia de octenidina, lo que sugiere una rápida introducción a la célula diana, alterar su fisiología. Este fenómeno fue apoyado por la microscopía fluorescente empleando calceína AM, que es retenida en el citoplasma de las células vivas. Como puede verse en la (Figura 3), después de la incubación con OCT, el núcleo y la célula parecía estar intoxicado por OCT en todas las concentraciones estudiadas. Idénticos resultados se observan cuando la Clorhexidina se añadió a cultivos de HeLa, lo que sugiere que tanto OCT y clorhexidina alteran la permeabilidad de la membrana que permite la salida de calceína AM.

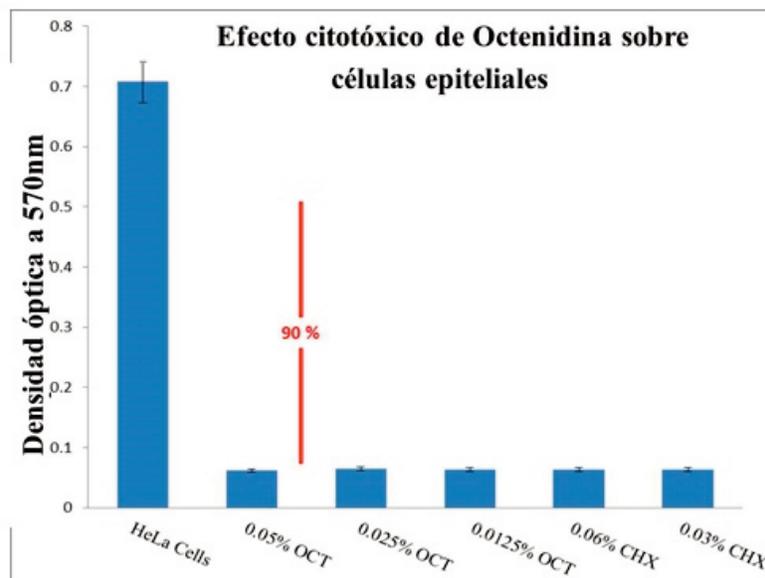


Figura 1. Efecto de Octenidine sobre las células epiteliales humanas. Las células HeLa se trataron con diferentes concentraciones de octenidina por 24 h. El número de células vivas se determinó mediante ensayo de viabilidad MTT. La clorhexidina se utilizó como control positivo de la toxicidad. Las densidades ópticas obtenidas por triplicado se midieron a 570 nm usando un lector de microplacas de absorbancia. Los experimentos se repitieron tres veces para asegurar la veracidad de los resultados.

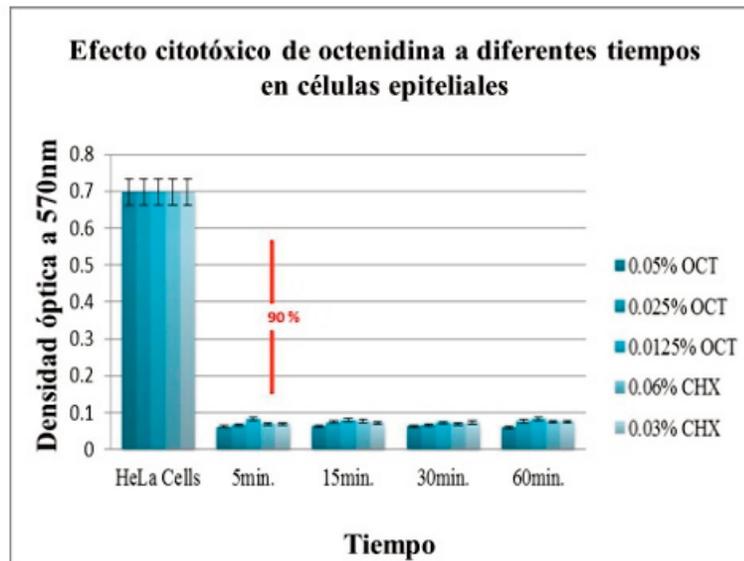


Figura 2. Tiempo-efecto de Octenidine en las células epiteliales humanas. Las células HeLa se trataron con diferentes concentraciones de octenidina por 5, 15, 30 y 60 minutos y el número de células vivas se determinó por ensayo de viabilidad MTT. La clorhexidina se utilizó como control positivo de la toxicidad. Las densidades ópticas obtenidas por triplicado se midieron a 570 nm usando un lector de microplacas de absorbancia. Los experimentos se repitieron tres veces para asegurar la veracidad de los resultados.

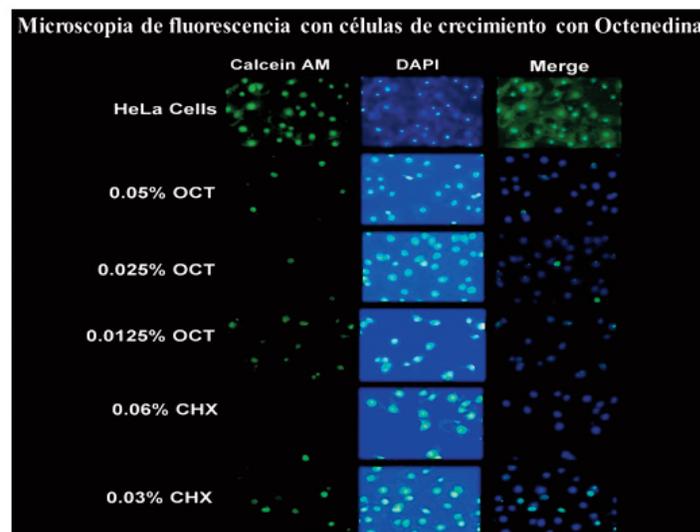


Figura 3. La citotoxicidad de Octenidine en las células epiteliales humanas por microscopía de fluorescencia. Las células HeLa se trataron con mismas técnicas describen anteriormente. Después de 24 h. de incubación, las células epiteliales se tiñeron con calceína AM, núcleo con DAPI y se observaron bajo microscopía de fluorescencia a 485 y 358 nm (Thornwood, NY). Las imágenes se analizaron utilizando software AxioVision (Thornwood, NY). La barra indica 5 µm.

Efecto de clorhidrato de Octenidina en el ADN genómico de las células epiteliales

Con el objetivo de caracterizar el efecto de OCT en las células humanas, ensayos de genotoxicidad se llevaron a cabo para determinar una posible lesión en el ADN de las células epiteliales expuestas al clorhidrato de Octenidina. Después de 24 h. de incubación con 0,05% de OCT, el ADN de las células se analizó por el ensayo de cometa y microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron una cola después de la tinción de ADN, indicando que el OCT afecta al ADN genómico (Figura 4). 0,06% de clorhexidina produjo la señal clásica de daños en el ADN genómico, como se esperaba (Figura 4). Estos resultados indican que el clorhidrato de Octenidina presentan alta toxicidad en el ADN genómico de las células epiteliales al mismo nivel de la clorhexidina en nuestras condiciones experimentales (Figura 2).

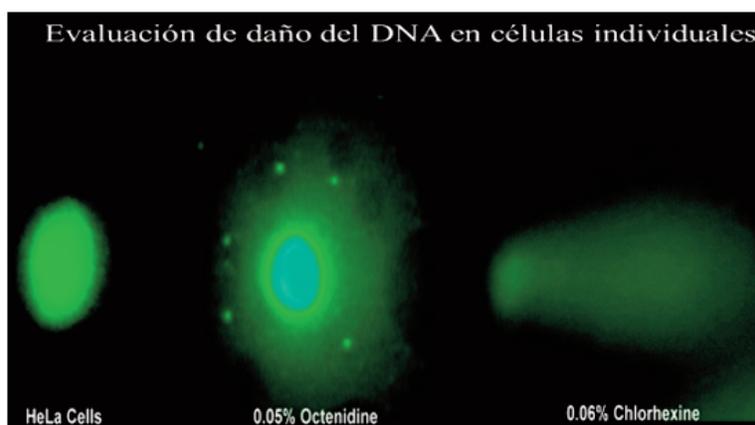


Figura 4. La genotoxicidad de Octenidine en las células epiteliales humanas mediante el ensayo de cometa y microscopía de fluorescencia. Las células HeLa cultivadas en medios de cultivo se usaron como control positivo. El efecto de 0,05% de octenidina y 0,06% de clorhexidina en las células HeLa se analizó después de 18 hrs. de incubación por microscopía de fluorescencia a 485 nm (Thornwood, NY). La presencia de una estela es indicativo de daño en el ADN.

La respuesta inflamatoria de las células epiteliales con Octenidina

Con el fin de explorar si las bajas concentraciones de octenidina podrían promover una respuesta inflamatoria de las células epiteliales, el nivel de IL6 se determinó mediante ensayo de ELISA. La figura 5 muestra un claro aumento en el nivel de IL6 cuando las células HeLa crecen en presencia de 1×10^{-3} de octenidina cuando se compara con las células HeLa. El nivel de IL-6 se elevó un 43,7% en presencia de octenidina.

En contraste, cuando se añadieron concentraciones altas (1×10^{-2} o más) de octenidina con cultivo de células cultivo, no había células vivas para desarrollar una respuesta inflamatoria.

Los mismos resultados se obtuvieron cuando se utilizó 1% de peróxido de hidrógeno en lugar de octenidina al 1×10^{-4} exhibieron un comportamiento similar al de las células HeLa. Estos datos sugieren que las bajas concentraciones de octenidina estimulan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias de células huésped.

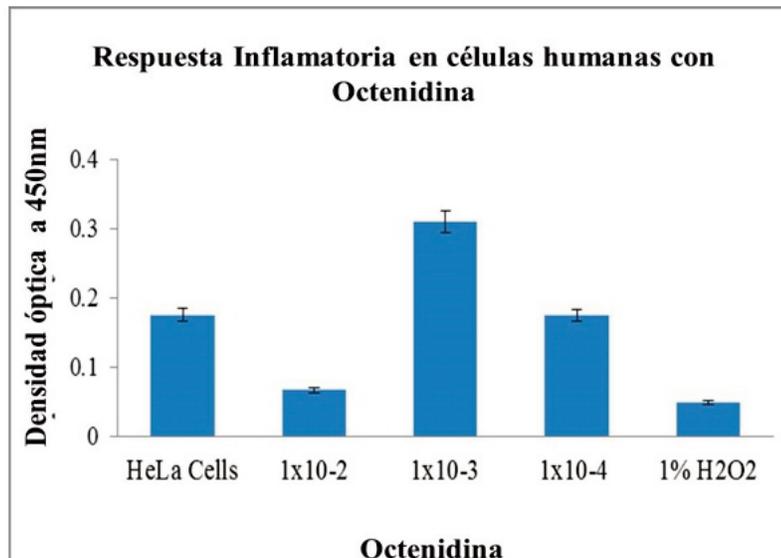


Figura 5. Respuesta inflamatoria de las células humanas con Octenidine. Las células HeLa que crecieron en medios de cultivo se usaron como control positivo. La capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria de 0,01, 0,001 y 0,0001% de octenidina y peróxido de hidrógeno 1% de las células HeLa se analizaron midiendo el nivel de IL6 mediante el Ensayo ELISA y la medición de densidades ópticas en un lector de absorbancia de microplacas a 450 nm. El promedio de tres experimentos fueron analizados con la seguridad de la veracidad de los resultados.

Efecto de apoptosis de clorhidrato de Octenidine en las células epiteliales humanas

Sobre la base de los últimos experimentos, se exploró si las bajas concentraciones de octenidina podrían conducir a la apoptosis de las células huésped utilizando el kit CF488A / 7AAD Ensayo de Apoptosis y citometría de flujo. Los resultados indican que la baja concentración de octenidina no promovió la apoptosis entre las células epiteliales humanas (Figura 6). No había diferencia entre 1×10^{-3} de octenidina y control (células que crecen sólo con medios de cultivo) que muestra un promedio similar de células vivas después de 24 horas de crecimiento. Estos resultados sugieren que las altas concentraciones de octenidina inhiben el crecimiento de células humanas mediante la alteración de las funciones básicas de las células huésped y menores cantidades de octenidina no son perjudiciales para las células humanas.

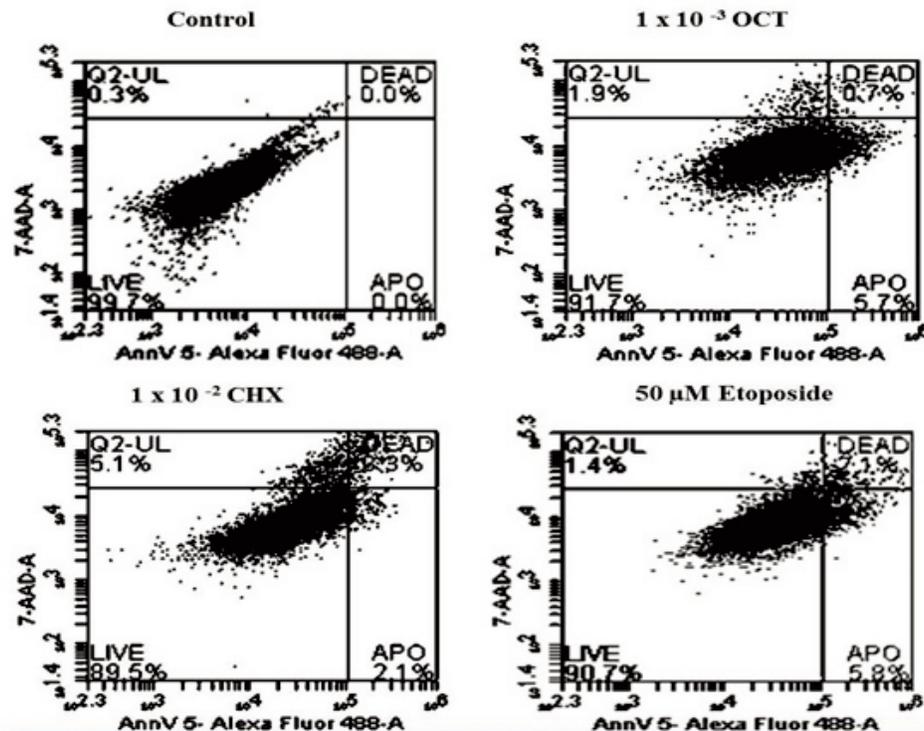


Figura 6. El efecto apoptótico de bajas concentraciones de Octenidine sobre las células humanas. La posible que lleva a la apoptosis de la célula huésped por 1x10⁻³ de octenidina fue explorada por Anexina V y ensayo de 7-AAD mediante citometría de flujo a 488 nm.

DISCUSIÓN

Está bien establecido el papel de la placa dental como la causa etiológica de la caries, la gingivitis y la enfermedad periodontal ²⁶⁻²⁸. El control mecánico de la placa se ha convertido en la piedra angular del tratamiento dental, sin embargo, la prevalencia casi omnipresente de la caries y la gingivitis podría sugerir que el control de biofilms dentales a través de medios mecánicos es ineficiente. Aunque muchos productos se han utilizado para controlar la placa y la gingivitis, incluyendo peróxido de hidrógeno ²⁹, hexetidina ³⁰, cloruro de cetilpiridinio ³¹, los aceites esenciales ³², etc., la clorhexidina es uno de los más ampliamente utilizados y bien investigado antisépticos. ampliamente utilizados y bien investigado antisépticos. Sin embargo, el efecto biocida de la clorhexidina no es exclusivo para los microorganismos patógenos. Varios informes indican un importante efecto citotóxico sobre una variedad de células de mamífero ^{5-9,33}.

Basándose en estos informes, otras moléculas atraídos interés para ser utilizado como colutorios orales. 0,1% de clorhidrato de octenidina se ha utilizado como antiséptico oral, principalmente en los países europeos. El OCT fue desarrollado en el Sterling Winthrop Research Institute como un agente antimicrobiano potencial tópico. Últimamente se encontró que este compuesto es eficaz en la inhibición del crecimiento de bacterias formadoras de placas ³⁴ y en una reducción del desarrollo de la placa en animales de experimentación ³⁵. Uno de los estudios recientes demostraron que un 0,1% enjuague bucal octenidina proporcionó reducciones estadísticamente significativas de 39% menos de placa, la gingivitis a 50% menos, y el 60% menos de los sitios de sangrado gingival ³⁶. Aunque se utiliza ampliamente, no hay informes sobre un posible efecto tóxico de la OCT en las células humanas.

En este trabajo se investigó la influencia de clorhidrato de octenidina en las células epiteliales humanas. Los resultados obtenidos mostraron una alta toxicidad para los dos, OCT y clorhexidina en todas las concentraciones finales analizadas y desde los p 5 minutos de exposición (Figuras 1 y 2). Para descartar un fenómeno exclusivo de las células HeLa, se utilizaron otras células epiteliales (células de riñón de mono, MA014) para analizar el efecto de la OCT, obteniendo resultados idénticos (datos no mostrados). Para confirmar los resultados anteriores, se siguió un procedimiento similar pero al observar la morfología de las células cultivadas con OCT y clorhexidina. Las imágenes de la figura 3 respaldan los datos descritos anteriormente donde muestran células sin integridad de la membrana y el núcleo deformado. Kocak et al., 2009 informó que 0,0001% de OCT mata a todos los *Streptococcus mutans* después de sólo 1 a 10 minutos de exposición ³⁷, este dato es de acuerdo con nuestros hallazgos en las células epiteliales humanas, lo que sugiere que la actividad biocida de no está restringido contra microbios patógenos como clorhexidina hace.

Con el fin de caracterizar la influencia tóxica de OCT en las células humanas, ensayos de genotoxicidad se llevaron a cabo para determinar una posible lesión en el ADN de las células epiteliales 24hrs. expuestas a Clorhidrato de octenidina. Después de 24 hrs. de exposición a OCT, el ADN genómico presentó una cola típica cuando se observaron por microscopía de fluorescencia, lo que sugiere daño en el ADN. En comparación con las células que crecen con la clorhexidina, mostraron una cola más alta que corroboran los informes anteriores de la genotoxicidad de clorhexidina ³⁸. Anteriormente, se ha informado que la clorhexidina presenta una mala absorción por los tejidos ³⁹, sin embargo, en nuestros experimentos que emplean cultivos de células de riñón de mono clorhexidina era extremadamente tóxico después de pocos minutos de exposición, lo que sugiere una rápida absorción a través de la membrana plasmática.

Cuando se estudió la respuesta inflamatoria, nuestros datos sugieren que las bajas concentraciones de octenidina estimulan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias de células huésped. Al igual que

todas las moléculas extrañas, la octenidina causar una respuesta del sistema inmune de las células HeLa. Se ha propuesto que un aumento en el nivel de las citoquinas pro-inflamatorias podría culminar con la activación de vías de la apoptosis, la destrucción de las células huésped⁴⁰. Sin embargo, cuando se utilizó la Anexina V para marcar las células apoptóticas, muy pocos de ellas estaban en estado de apoptosis y no se detectaron diferencias entre las células que crecen con medios de cultivo. Estos resultados sugieren que las altas concentraciones de la octenidina inhiben el crecimiento de células humanas puede ser debido a la alteración de las funciones básicas de las células huésped y menores cantidades de la octenidina no son perjudiciales para las células humanas.

No se sabe cómo la octenidina causa el efecto tóxico en las células epiteliales. El producto comercial (Octenidol; Shülke y Mayr GmbH, Norderstedt, Alemania) presenta un pH de 4, pero ignora si toda la citotoxicidad encontrado en este trabajo se puede atribuir a su bajo pH. Sobre la base de experimentos con AM de calceína, se sugiere un fuerte daño en la membrana plasmática, alterando su permeabilidad con una lesión de ADN posteriormente debido a OCT analizado. Son necesarios más estudios para explicar con detalle todas las interacciones bioquímicas de la OCT con las moléculas celulares.

Conclusiones

En conclusión, nuestro estudio muestra que el 0,1% de octenidina presenta una alta toxicidad sobre las células epiteliales humanas que sugieren su uso desde hace mucho tiempo que podría ser perjudicial para las personas. Por lo tanto, los efectos nocivos beneficiosos y potenciales de octenidina en los seres humanos deben ser sopesados en estudios in vivo.

Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo declaran que no son posibles intereses contrapuestos entre los autores de este trabajo.

Expresiones de gratitud

Los autores desean agradecer a Erika E. Coronado-Cerda y Moisés A. Franco-Molina, de FCB-UANL por su apoyo en la citometría de flujo. Por último, Carlos Galván-Caudillo quiere dar las gracias a CONACYT por su beca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Van Strydonck, D. A., Slot, D. E., Van der Velden, U. & Van der Weijden, F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of clinical periodontology* 39, 1042-1055, doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01883.x (2012).
- 2 Chainani, S. H. et al. Antiplaque and antigingivitis efficacy of triphala and chlorhexidine mouthrinse among schoolchildren - a cross-over, double-blind, randomised controlled trial. *Oral health & preventive dentistry* 12, 209-217, doi:10.3290/j.ohpd.a32674 (2014).
- 3 Schroeder, H. E. Formation and inhibition of dental calculus. *Journal of periodontology* 40, 643-646, doi:10.1902/jop.1969.40.11.643 (1969).
- 4 Jones, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology 2000* 15, 55-62 (1997).
- 5 Louis, S. M. & Pearson, R. M. A comparison of the effects of nonoxynol-9 and chlorhexidine on sperm motility. *Contraception* 32, 199-205 (1985).
- 6 Kenney, E. B., Saxe, S. R. & Bowles, R. D. Effect of chlorhexidine on human polymorphonuclear leucocytes. *Archives of oral biology* 17, 1633-1636 (1972).
- 7 Knuutila, M. & Soderling, E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta odontologica Scandinavica* 39, 285-289 (1981).
- 8 Helgeland, K., Heyden, G. & Rolla, G. Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. *Scandinavian journal of dental research* 79, 209-215 (1971).
- 9 Pucher, J. J. & Daniel, J. C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *Journal of periodontology* 63, 526-532, doi:10.1902/jop.1992.63.6.526 (1992).
- 10 Patters, M. R. et al. Inhibition of plaque formation in humans by octenidine mouthrinse. *Journal of periodontal research* 18, 212-219 (1983).
- 11 Shern, R. J., Monell-Torrens, E. & Kingman, A. Effect of two recently developed antiseptics on dental plaque and caries in rats. *Caries research* 19, 458-465 (1985).
- 12 Decker, E. M., Weiger, R., Wiech, I., Heide, P. E. & Brecx, M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *European journal of oral sciences* 111, 144-148 (2003).
- 13 Tandjung, L. et al. Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. *International endodontic journal* 40, 845-851, doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01279.x (2007).
- 14 Youngner, J. S. Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 85, 202-205 (1954).

- 15 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63 (1983).
- 16 Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. & Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry* 69, 581-593 (1997).
- 17 Bozyczko-Coyne, D., McKenna, B. W., Connors, T. J. & Neff, N. T. A rapid fluorometric assay to measure neuronal survival in vitro. *Journal of neuroscience methods* 50, 205-216 (1993).
- 18 Akeson, A. L. & Woods, C. W. A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *Journal of immunological methods* 163, 181-185 (1993).
- 19 Kubista, M., Akerman, B. & Norden, B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26, 4545-4553 (1987).
- 20 Ostling, O. & Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123, 291-298 (1984).
- 21 De Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G., Vande, P. A. & Kirsch-Volders, M. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation research* 469, 181-197 (2000).
- 22 Soda, K., Kano, Y., Kawakami, M. & Konishi, F. Excessive increase of serum interleukin 6 jeopardizes host defense against multi-bacterial infection. *Cytokine* 21, 295-302 (2003).
- 23 Chung, Y. C. & Chang, Y. F. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of surgical oncology* 83, 222-226, doi:10.1002/jso.10269 (2003).
- 24 Boersma, A. W., Nooter, K., Oostrum, R. G. & Stoter, G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry* 24, 123-130, doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19960601)24:2<123::AID-CYTO4>3.0.CO;2-K (1996).
- 25 Zelenin, A. V. et al. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry* 5, 348-354, doi:10.1002/cyto.990050410 (1984).
- 26 Costerton, J. W. Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology* 15, 137-140 (1995).
- 27 Loe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Smith, M. The natural history of periodontal disease in man. Study design and baseline data. *Journal of periodontal research* 13, 550-562 (1978).
- 28 Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of periodontology* 36, 177-187, doi:10.1902/jop.1965.36.3.177 (1965).

-
- 29 Hossainian, N., Slot, D. E., Afennich, F. & Van der Weijden, G. A. The effects of hydrogen peroxide mouth washes on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *International journal of dental hygiene* 9, 171-181, doi:10.1111/j.1601-5037.2010.00492.x (2011).
- 30 Afennich, F., Slot, D. E., Hossainian, N. & Van der Weijden, G. A. The effect of hexetidine mouthwash on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *International journal of dental hygiene* 9, 182-190, doi:10.1111/j.1601-5037.2010.00478.x (2011).
- 31 Haps, S., Slot, D. E., Berchier, C. E. & Van der Weijden, G. A. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *International journal of dental hygiene* 6, 290-303, doi:10.1111/j.1601-5037.2008.00344.x (2008).
- 32 Berchier, C. E., Slot, D. E., Haps, S. & Van der Weijden, G. A. The efficacy of dental floss in addition to a toothbrush on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *International journal of dental hygiene* 6, 265-279, doi:10.1111/j.1601-5037.2008.00336.x (2008).
- 33 Silvestri, D. L. & McEnery-Stonelake, M. Chlorhexidine: uses and adverse reactions. *Dermatitis: contact, atopic, occupational, drug* 24, 112-118, doi:10.1097/DER.0b013e3182905561 (2013).
- 34 Bailey, D. M. et al. Bispyridinamines: a new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque. *Journal of medicinal chemistry* 27, 1457-1464 (1984).
- 35 Emilson, C. G., Bowen, W. H., Robrish, S. A. & Kemp, C. W. Effect of the antibacterial agents octenidine and chlorhexidine on the plaque flora in primates. *Scandinavian journal of dental research* 89, 384-392
- 36 Beiswanger, B. B., Mallatt, M. E., Mau, M. S., Jackson, R. D. & Hennon, D. K. The clinical effects of a mouthrinse containing 0.1% octenidine. *Journal of dental research* 69, 454-457 (1990).
- 37 Kocak, M. M., Ozcan, S., Kocak, S., Topuz, O. & Erten, H. Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of streptococcus mutans in saliva. *European journal of dentistry* 3, 57-61 (2009).
- 38 Mariotti, A. J. & Rumpf, D. A. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *Journal of periodontology* 70, 1443-1448, doi:10.902/jop.1999.70.12.1443 (1999).
- 39 Rushton, A. Safety of Hibitane. II. Human experience. *Journal of clinical periodontology* 4, 73-79 (1977).
- 40 Haanen, C. & Vermes, I. Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation* 4, 5-15, doi: 10.1155/S0962935195000020 (1995).

Autor de correspondencia:
Claudio Cabral Romero
claudiohubble@hotmail.com

Artículo recibido: 27 de Abril de 2016.
Artículo aprobado para publicación: 3 de Junio de 2016.