

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 confluente¹⁴.

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 Octenidina 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 MA104 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 re-suspendieron con un tampón 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 Octenidina en las células epiteliales humanas.

Con el fin de determinar la posible citotoxicidad del clorhidrato de octenidina, 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 el crecimiento 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 expuestas 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.

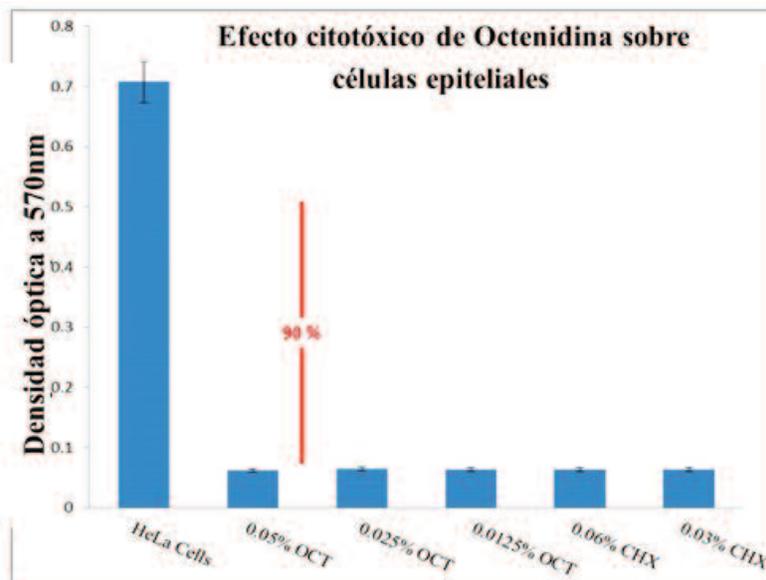


Figura 1. Efecto de Octenidina sobre las células epiteliales humanas. Las células HeLa se trataron con diferentes concentraciones de octenidina por 24 h. El número de células vivas se determinó mediante ensayo de viabilidad MTT. La clorhexidina se utilizó como control positivo de la toxicidad. Las densidades 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.

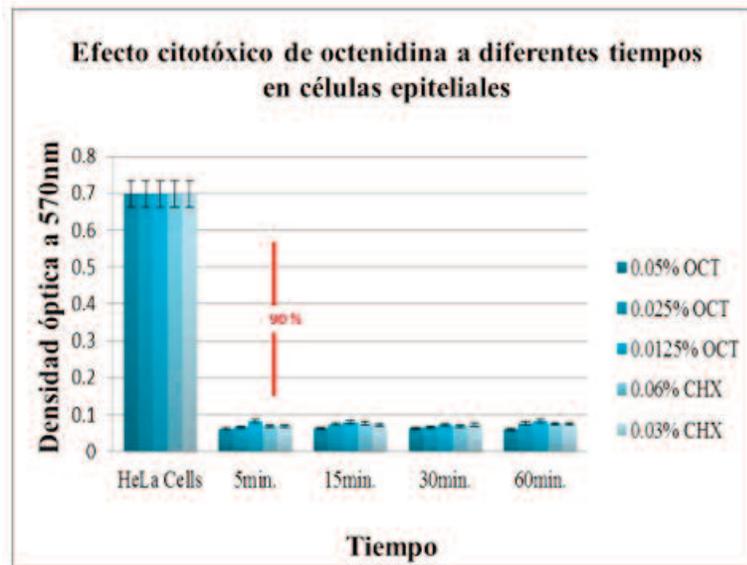


Figura 2. Tiempo-efecto de octenidina en las células epiteliales humanas. Las células HeLa se trataron con diferentes concentraciones de octenidina por 5, 15, 30 y 60 minutos y el número de células vivas se determinó por ensayo de viabilidad MTT. La clorhexidina se utilizó como control positivo de la 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.

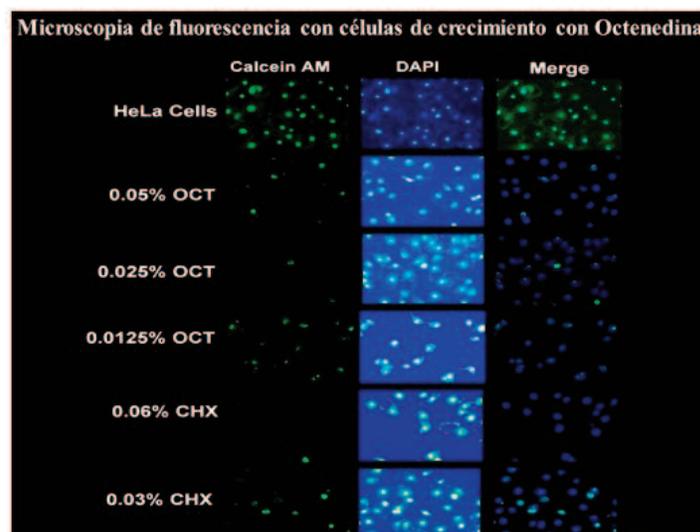


Figura 3. La citotoxicidad de octenidina en las células epiteliales humanas por microscopía de fluorescencia. Las células HeLa se trataron con las mismas técnicas que se describen anteriormente. Después de 24 h. de incubación, las células epiteliales se tiñeron con calceína AM, núcleo con DAPI y se observaron 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).

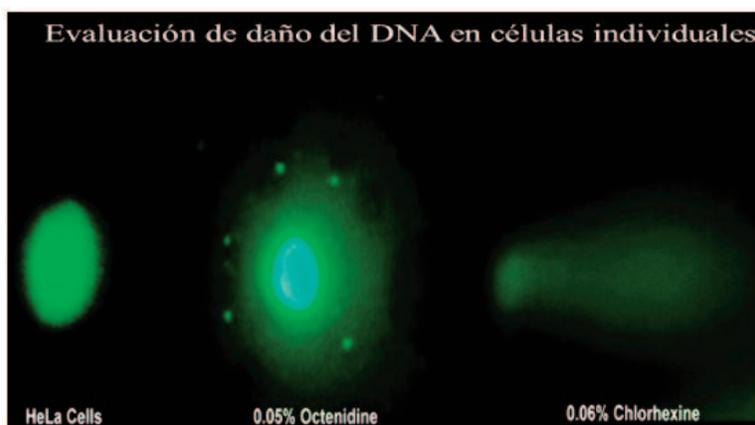


Figura 4. La genotoxicidad de octenidina en las células epiteliales humanas mediante el ensayo de cometa y microscopía de fluorescencia. Las células HeLa cultivadas en medios de cultivo se usaron como control positivo. El efecto de 0.05% de octenidina y 0.06% de clorhexidina en las células HeLa se analizó 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.

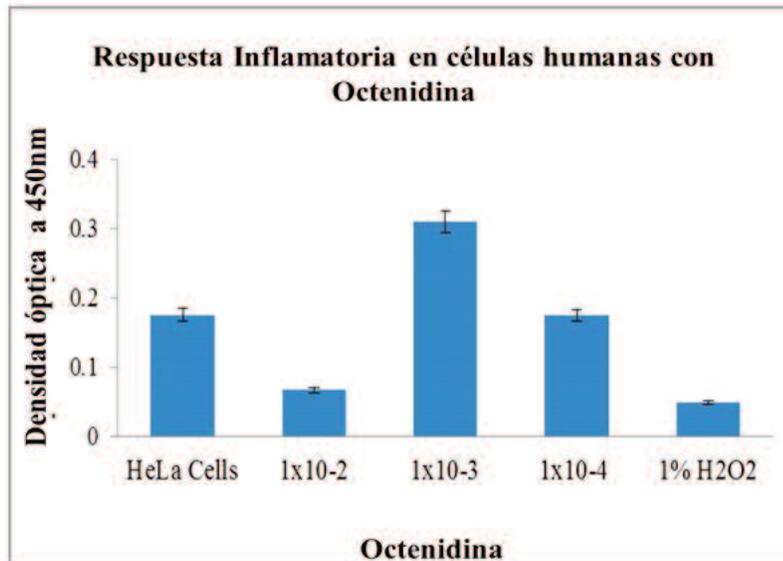


Figura 5. Respuesta inflamatoria de las células humanas con octenidina. Las células HeLa que crecieron en medios de cultivo se usaron como control positivo. La capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria de 0.01, 0.001 y 0.0001% de octenidina y peróxido de hidrógeno 1% de las células HeLa se analizaron 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 Octenidina 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.

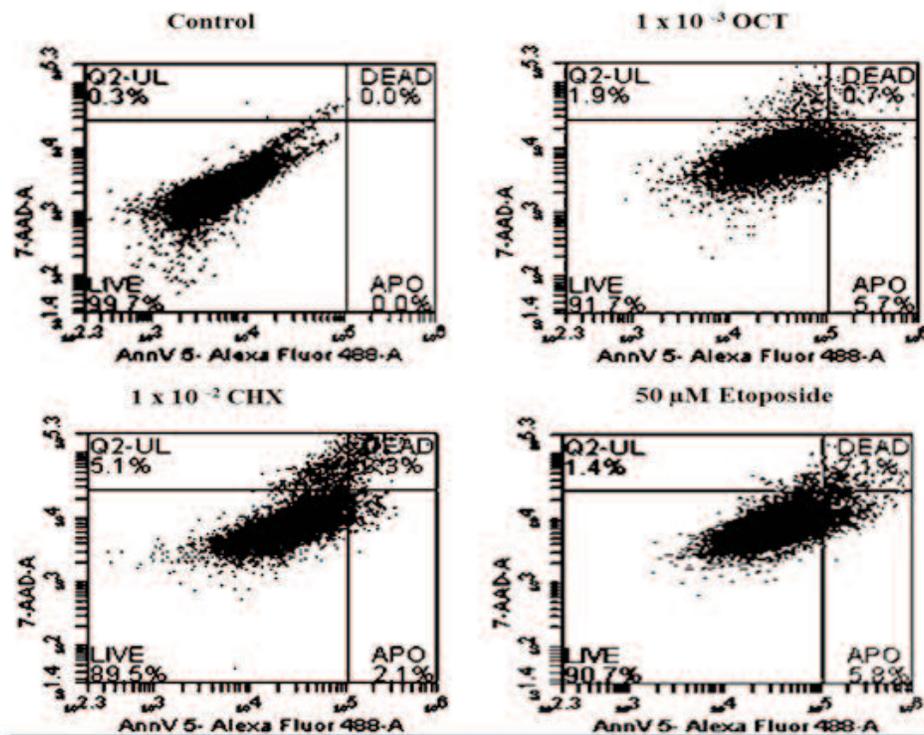


Figura 6. El efecto apoptótico de bajas concentraciones de octenidina sobre las células humanas. La posible que lleva a la apoptosis de la célula huésped por 1×10^{-3} de octenidina fue explorada por Anexina V y ensayo de 7-AAD mediante citometría de flujo a 488 nm.

DISCUSIÓN

Está bien establecido el papel de la placa dental como la causa etiológica de la caries, la gingivitis y la enfermedad periodontal²⁶⁻²⁸. 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 hidrógeno²⁹, hexetidina³⁰, cloruro de cetilpiridinio³¹, los aceites esenciales³², 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 han atraído interés para ser utilizadas como colutorios orales. El 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 placas³⁴ y en una reducción del desarrollo de la placa en animales de experimentación³⁵. 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 gingival³⁶. 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 exposición³⁷, 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 24 hrs. 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 clorhexidina³⁸. Anteriormente, se ha informado que la clorhexidina presenta una mala absorción por los tejidos³⁹, 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 pocas 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 se ignora si toda la citotoxicidad encontrada 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.

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. & Brex, 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).

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.

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.