



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Gustavo D'Angieri Saugo

Comparação entre a citotoxicidade da clorexidina e do Blue®M quando aplicados a uma linhagem celular de fibroblasto gengival humano (HGF-1) e queratinócitos (NOK-SI): estudo in vitro

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Gustavo D'Angieri Saugo

Comparação entre a citotoxicidade da clorexidina e do Blue®M quando aplicados a uma linhagem celular de fibroblasto gengival humano (HGF-1) e queratinócitos (NOK-SI): estudo in vitro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Valfrido Antonio Pereira Filho

Araraquara
2023

S255c Saugo, Gustavo D'Angieri
Comparação entre a citotoxicidade da clorexidina e do Blue®M quando aplicados a uma linhagem celular de fibroblasto gengival humano (HGF-1) e queratinócitos (NOK-SI) : estudo in vitro / Gustavo D'Angieri Saugo. -- Araraquara, 2023
37 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Valfrido Antonio Pereira Filho

1. Cicatrização. 2. Regeneração óssea. 3. Clorexidina. 4. Cirurgia bucal. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gustavo D'Angieri Saugo

Comparação entre a citotoxicidade da clorexidina e do Blue®M quando aplicados a uma linhagem celular de fibroblasto gengival humano (HGF-1) e queratinócitos (NOK-SI): estudo in vitro

Orientador: Prof (a) Dr (a) Valfrido Antonio Pereira Filho

Assinatura Orientador (a):



Assinatura Aluno (a):



Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu irmão, minha cunhada e minha namorada eu agradeço eternamente por toda a força que me deram ao longo da minha trajetória na Odontologia sem vocês ao meu lado nada disso seria possível.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº2019/26431-4) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Saugo GD. Comparação entre a citotoxicidade da clorexidina e do Blue®M quando aplicados a uma linhagem celular de fibroblasto gengival humano (HGF-1) e queratinócitos (NOK-SI): estudo in vitro [Trabalho de Conclusão de Curso — Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

A clorexidina (CHX) tem sido amplamente utilizada como um dos principais agentes bactericidas. No entanto, a literatura demonstrou o seu potencial citotóxico sobre fibroblastos, osteoblastos além de interferir na angiogênese. Em contrapartida, o Blue®M surgiu com o objetivo de favorecer o reparo dos tecidos bucais por meio da liberação de oxigênio reativo. Este estudo se propõe a avaliar os efeitos citotóxicos da clorexidina e do Blue®M, em diferentes diluições, sobre fibroblastos e queratinócitos. As linhagens celulares cultivadas foram o fibroblasto gengival humano (HGF-1) e a de queratinócitos da mucosa oral (NOK-SI). O teste de dose-efeito (IC50) em fibroblastos demonstrou que o Blue®M reduziu metade das células viáveis com uma dose 4x menor do que a CHX (CHX: 173.07 ± 10.27 ; Blue®M: 43.86 ± 3.04). O teste de proliferação celular em 24 e 48h apontou redução de 8 vezes de células HGF-1 tratadas com CHX; e até 18 vezes para o Blue®M enquanto os queratinócitos mostraram redução significativa somente no período de 48h. Os testes de apoptose e necrose para HGF-1 revelaram aumento de 25% ($p < 0,0001$) para ambos os compostos, enquanto para os queratinócitos, taxas de apoptose de 10% ($p = 0,02$) e 15% ($p = 0,001$) para CHX e Blue®M, respectivamente. Por fim, o ensaio de migração em monocamada, a linhagem HGF-1 tratada com Blue®M apresentou redução significativa na capacidade de fechamento da camada celular até 24h ($p = 0,0001$). Os testes corroboraram entre si sobre o potencial citotóxico do Blue®M principalmente sobre fibroblastos, com menor proliferação e migração, além de aumentar a morte celular. Já nos queratinócitos, apesar de manterem as taxas de migração, houve uma redução da proliferação e aumento da morte celular. Apesar das limitações do modelo in-vitro, os dados questionam o uso do Blue®M como um adjuvante no processo de reparo tecidual.

Palavras – chave: Cicatrização. Regeneração óssea. Clorexidina. Cirurgia bucal.

Saugo GD. Cytotoxicity evaluation of Chlorhexidine and Blue®M applied to a human gingival fibroblast (HGF-1) and keratinocytes (NOK-SI): in vitro study [Trabalho de Conclusão de Curso — Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Antiseptic Chlorhexidine (CHX) has been widely used as a prime choice to prevent oral infections, but its cytotoxic effect on fibroblasts and osteoblasts has been demonstrated. Conversely, Blue®M has emerged to enhance tissue repair under reactive oxygen release. This study aimed to evaluate the biological impacts of Blue®M on fibroblasts and normal oral keratinocytes compared to CHX. Cell culture using human gingival fibroblast (HGF-1) and normal oral keratinocytes (NOK-SI) were performed to evaluate cell proliferation, apoptosis, cell cycle, and migration. On the dose-effect test (IC₅₀), Blue®M reduced the HGF-1 by half with a concentration four times lower than CHX (CHX: 173.07 ±10.27; Blue®M: ±343.86.04). HGF-1 proliferation test along 24 and 48 h revealed an eightfold reduction for CHX while for Blue®M the proliferation rate was eighteen times lower. The apoptosis and necrosis rates increased by 25% ($p < 0.0001$) for HGF-1 when in contact with both substances. In NOK-SI, the apoptosis rates increased by 10% ($p = 0.02$) and 15% ($p = 0.001$) for CHX and Blue®M, respectively. Furthermore, Blue®M showed a substantially lower capacity for wound closure in the monolayer migration assay. The different tests demonstrated higher cytotoxicity of Blue®M compared to CHX, especially on fibroblasts. Despite the limitations of this *in vitro* study, the data call into question the beneficial effect of Blue®M on the oral mucosal repair.

Keywords: Wound healing. Bone regeneration. Chlorhexidine. Surgery, oral.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 10 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 11 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO. | 12 |
| 4.1 Preparo das soluções de clorexidina e Blue®m | 12 |
| 4.2 Ensaio de viabilidade celular com XTT | 12 |
| 4.3 Dose-efeito da CHX e Blue®m in vitro | 13 |
| 4.4 Ensaio de proliferação celular | 13 |
| 4.5 Ensaio de morte celular por apoptose e necrose | 14 |
| 4.6 Ensaio de ciclo celular | 14 |
| 4.7 Ensaio de migração em monocamada in vitro | 15 |
| 4.8 Envio ao comitê de ética em pesquisa..... | 15 |
| 4.9 Análise estatística..... | 15 |
| 5 RESULTADO | 17 |
| 5.1 Preparo das soluções de CHX e Blue®M..... | 17 |
| 5.2 Dose-efeito da CHX e Blue®M in vitro | 17 |
| 5.3 Ensaio de proliferação celular | 18 |
| 5.4 Morte celular por apoptose e necrose | 23 |
| 5.5 Migração celular em monocamada in vitro | 25 |
| 6 DISCUSSÃO | 27 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 32 |
| REFERÊNCIAS | 33 |
| ANEXO A | 36 |

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a definição de Junqueira e Carneiro¹, os fibroblastos são células de origem mesenquimal e tem por função a produção de componentes fibrilares (colágeno e elastina) e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Uma série de fatores físicos, químicos e ambientais podem reduzir sua capacidade proliferativa ou provocar alterações morfológicas que induzem à morte celular programada (apoptose).

Em relação ao colágeno, ele é o principal componente da matriz extracelular e sua renovação é fundamental para os reparos teciduais. Existem alguns fatores de crescimento, como o TGF- β e o próprio lactato liberado em quadros de hipóxia que auxiliam na remodelação da matriz extracelular². Isso resulta em maior migração de fibroblastos e proliferação, aumenta o colágeno e a metaloproteinase da matriz (MMP-2) e juntamente com o VEGF — fator angiogênico, promovem a proliferação, sobrevivência e morfogênese das células endoteliais.

Conforme descrito por Karpinski e Szkaradkiewicz³, a clorexidina (CHX) é um dos antissépticos mais utilizados atualmente, principalmente na odontologia. Em baixas concentrações a CHX é bacteriostática e em altas concentrações, atua como bactericida causando a morte celular por citólise. Além disso, diversos estudos confirmaram os efeitos benéficos da CHX na redução do acúmulo de placa bacteriana, em cárie dentária, gengivite, periodontite, além de prevenir infecções bacterianas. Infelizmente, a CHX exibe atividade citotóxica nas células humanas^{4,5}. Devido aos seus efeitos colaterais, seu uso na odontologia deve ser realizado de forma criteriosa.

Na análise da dose (0,01% a 0,12%) e tempo (1 min) em que o tecido foi exposto, a clorexidina foi capaz de promover distúrbios na função mitocondrial, aumentar o cálcio intracelular e causar estresse oxidativo tardio (cerca de 30 min após a remoção da CHX) principalmente em células osteoblásticas. Nestas, com CHX a 0,1% durante 1 min houve redução significativa do potencial de membrana da mitocôndria. Fibroblastos e células endoteliais, apesar de se mostrarem mais resistentes a agressão - as quais foram apresentados danos relevantes a 0,12%-apresentaram redução da viabilidade celular em até 80%⁶. Além disso existe evidência na qual a clorexidina em concentrações mais elevadas, até 2% bloqueia

de forma permanente a migração celular e reduz significativamente a sobrevivência de fibroblastos, mioblastos e osteoblastos *in vitro*⁷. A diluição também é uma variável a ser considerada no momento da análise dos efeitos deletérios da CHX sobre a homeostase celular. O uso do fármaco de forma não diluída induziu a morte celular na maior parte da amostra 24 horas após com aplicação de 60 segundos sobre as células. Enquanto a utilização na forma diluída da CHX reduziu a migração celular e a sobrevivência a longo prazo⁸.

No que diz respeito a utilização da CHX em procedimentos de regeneração óssea, como enxertos, ela tem sido utilizada tanto na forma de colutório como na apresentação em gel, este último em concentrações que variam de 0,12 a 2%^{9,10}. Seu uso tem sido descrito tanto de maneira preventiva, como após o surgimento de infecção local ou para manutenção da vitalidade do enxerto/biomaterial em casos de exposição na cavidade bucal, considerando que em muitos casos, malhas de titânio e membranas são utilizadas como coadjuvantes no processo de regeneração óssea¹¹. Nestes casos de exposições, a depender do tamanho da comunicação como o meio bucal, o sucesso do tratamento é incerto, podendo ser agravado devido ao potencial citotóxico da clorexidina nas diferentes concentrações.

Recentemente, outro produto disponível comercialmente se propõe a atuar como agente antisséptico nos tecidos bucais, conhecido comercialmente por Blue®M um potencial substituto da clorexidina. Embora não exista ampla literatura sobre seus possíveis efeitos colaterais aos tecidos bucais, seu princípio ativo a base do oxigênio reativo, poderia trazer os benefícios quando comparado com a CHX, como redução dos processos inflamatórios e/ou infecciosos, além de não interferir negativamente no processo de cicatrização e reparo de lesões, podendo também ser utilizado de forma adjuvante nos procedimentos pós-operatórios de enxertias ósseas e implantes osseointegrados, desde que seu uso seja realizado em concentrações ideais afim de evitar um quadro de estresse oxidativo^{12,13}.

Quanto ao mecanismo de ação do oxigênio reativo, a partir da metabolização do oxigênio no interior da célula são geradas as espécies reativas de oxigênio (ERO's). Embora a mitocôndria seja a principal fonte geradora, por meio da cadeia transportadora de elétrons, os ERO's também podem ser oriundos das membranas celulares e do citoplasma. Nesse processo é gerado H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), uma espécie com alto potencial reativo.

Os benefícios das espécies reativas de oxigênio (ERO's) têm sido descritos em alguns estudos^{14,15}. São formadas a partir da dissociação espontânea do peróxido de hidrogênio e devido aos efeitos de quimiotaxia dos leucócitos e peroxidação lipídica das paredes celulares bacterianas é considerado um relevante agente antibacteriano. Em equilíbrio, os ERO's são extremamente importantes para a homeostase celular atuando como mensageiros em vias de sinalização de insulina, hormônio de crescimento, citocinas, e até mesmo controlar a expressão de alguns grupos de genes, como genes envolvidos no metabolismo mitocondrial. O conceito dos ERO's tem sido aplicado a ozônioterapia¹⁶. Outra vantagem creditada a técnica que emprega oxigênio reativo é a capacidade de angiogênese, favorecimento dos mecanismos de remodelação óssea — atuando nas células da matriz óssea- o que acaba por favorecer o processo de reparo dos tecidos orais, como nas técnicas de regeneração óssea¹⁷. No entanto, em doses elevadas podem causar injúrias a homeostase, um exemplo é o H₂O₂, o qual tem longa atividade bioquímica além de ser capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células¹⁸.

De acordo com o estudo de Cunha et al.¹⁹ o Blue®M pode ser considerado uma opção viável para emprego clínico, principalmente em situações de quadros inflamatórios, infecciosos e reparação tecidual pois nenhum efeito adverso tem sido relatado e sua formulação a base de oxigênio e lactoferrina mostraram-se eficazes no controle da infecção periodontal. Além disso, a lactoferrina é uma proteína capaz de transferir íons ferro e apresenta propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo avaliou os efeitos citotóxicos da clorexidina e do Blue®M, em diferentes concentrações, sobre fibroblastos (HGF-1) e queratinócitos (NOK-SI).

3 REVISÃO DA LITERATURA

Durante a condução do presente trabalho de conclusão do curso houve uma forte carência de evidências científicas em relação aos reais efeitos e consequências da utilização do colutório Blue®M em procedimentos cirúrgicos orais, principalmente no pré e pós operatório. Após uma intensa busca de novas evidências ainda não é possível encontrar dados relevantes para a revisão da literatura. Portanto, destaco a importância da condução de novas pesquisas com o Blue®M em procedimentos cirúrgicos orais.

4 MATERIAL E MÉTODO

A linhagem celular de fibroblasto gengival humano HGF-1 foi cultivada em meio de cultura DMEM (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB — Cultilab, Brasil) inativado, 4mM de L-glutamina, 50U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina (Invitrogen Life Technologies, EUA; doravante denominado DMEM completo) a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A linhagem celular de queratinócitos derivados de mucosa bucal humana e naturalmente imortalizada, NOK-SI (CVCL_BW57), foi utilizada como controle e encontrava-se armazenada no laboratório de cultura de células e de biologia molecular e celular da Faculdade de Odontologia de Araraquara — UNESP.

4.1 Preparo das soluções de Cloredidina e Blue®M

Para os experimentos em cultura de células, CHX (solução manipulada a 0,12%) e Blue®M serão diluídos em meio de cultura para atingir as concentrações de tratamento in vitro que serão calculadas como descrito no item 3.4. As diluições em meio de cultura DMEM são necessárias para verificar os efeitos de cada produto em células de linhagem de fibroblasto isoladas e, portanto, não dispostas em uma organização tecidual, tal como na cavidade bucal. Se não diluídos, estes produtos podem provocar imediatamente uma morte celular nos experimentos in vitro. As diluições serão seriadas considerando o fator de diluição igual a 2 (1X, 1/2X, 1/4X, 1/8X) para se estabelecer a concentração adequada e mostrar potenciais diferenças ou semelhanças dos efeitos citotóxicos.

4.2 Ensaio de viabilidade celular com XTT

O ensaio de viabilidade das células HGF-1 tratadas com CHX ou Blue®M foi realizado em placas de microtitulação de 96 wells. Após os tempos de tratamento, as células serão lavadas com 0,2 ml de PBS para retirar as células não aderidas. No final da lavagem, serão adicionados 0,2 ml de PBS e 0,02 ml de XTT (Sigma-Aldrich, EUA) na proporção 9:1 para análise da atividade mitocondrial. As células serão incubadas com essa solução de XTT por aproximadamente 2h a 37 °C em

atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. Em seguida, a absorbância foi determinada em 490nm utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, EUA), e os dados analisados no software SoftMax[®] Pro 5 (Molecular Devices, EUA).

4.3 Dose-efeito da CHX e Blue[®]M in vitro

Cerca de 5.10^4 células HGF-1 foram distribuídas em placas de 6 poços (Corning, EUA) contendo 3mL de DMEM completo por poço com concentrações crescentes de CHX 0,12% ou Blue[®]M (1/8 X, 1/4X, 1/2X, 1X). As concentrações a serem testadas in vitro serão estabelecidas a partir da concentração usada na prática clínica (0,12% - 1X para CHX e concentração não disponibilizada pelos fabricantes deste produto comercial - 1X para Blue[®]M). Estes produtos possuem pH neutro e não apresentam álcool em sua formulação, mas os demais diluentes não são disponibilizados pelos fabricantes, portanto, uma quantidade igual de PBS foi utilizada como veículo controle. Completadas 24h ou 48h de tratamento, as células serão coletadas e avaliadas quanto a sua viabilidade por meio do ensaio de XTT (técnica descrita no item 3.3). Os resultados serão obtidos após a realização de 3 experimentos em triplicata a partir do cálculo da fração de efeito (Fe) de cada droga ou combinação em diferentes concentrações, por meio da equação: $Fe = 1 - (\text{média do número de células viáveis do grupo tratado} / \text{média do número de células viáveis do grupo controle}) \times 100\%$. O índice IC₅₀ (concentração inibitória da droga que reduz em 50% o número de células viáveis) foi determinado por meio do método desenvolvido por Chou e Talalay (1984), com auxílio do software Calcsyn (Biosoft, Reino Unido).

4.4 Ensaio de proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular in vitro, 5.10^4 células/mL foram distribuídas em placas de 6 poços (Corning), cada um deles contendo 3mL de DMEM completo e tratadas com clorexidina e Blue[®]M nas doses correspondentes às IC₅₀, além dos veículos, pelos tempos de 24, 48h e 72h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células foram recuperadas, diluídas 1:1 em Azul de Tripán 0,4% e contadas em câmara de Neubauer por meio de microscopia óptica. A proliferação

também foi avaliada por meio de citometria de fluxo. Após os tratamentos as células foram marcadas com ki-67-PE Cy7 (clone B56, BD Biosciences, EUA) seguindo as recomendações e reagentes do fabricante. Os eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, EUA) e analisados com o auxílio do software FlowJo 7.1 (Tree Star, EUA).

4.5 Ensaios de morte celular por apoptose e necrose

As análises das porcentagens de células em apoptose foram realizadas por citometria de fluxo utilizando-se marcação com Anexina V e iodeto de propídeo (IP). Suspensões celulares de $5 \cdot 10^4$ células/mL foram distribuídas em placas de 6 poços (Corning), cada um deles com 3mL de DMEM contendo os tratamentos em estudo, bem como o veículo, por 24 e 48h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de tampão de ligação (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂

- pH 7,4) e incubadas com 5µL de Anexina V conjugada com alofocianina (APC - BD Pharmingen™, EUA) e 10µL de IP (solução de 50µg/mL - Sigma-Aldrich) por 20min no escuro e à temperatura ambiente. Os eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, EUA) e a análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software* FlowJo 7.1 (Tree Star, EUA), sendo realizados pelo menos 2 experimentos em triplicata.

4.6 Ensaios de ciclo celular

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S ou G2/M) foi determinada por citometria de fluxo por meio de marcação com iodeto de propídeo (IP). Suspensões celulares de $5 \cdot 10^4$ células/mL foram distribuídas em placas de 6 poços (Corning), cada um deles com 3mL de DMEM contendo os tratamentos em estudo, bem como o veículo, e incubadas por 24 ou 48h em estufa 37°C com 5% de CO₂. Ao final de cada período, as células foram coletadas, fixadas e permeabilizadas com etanol a 70% gelado por pelo menos 12h a -20°C. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS gelado e tratadas com 10 µg/mL de RNase (Sigma) a 37°C durante 1h. Em seguida, estas foram coradas

com 50 µg/mL de IP a 4°C, no escuro, por 2h e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences). Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, foi utilizado o programa ModFit LTTM (Verity Software House, EUA), sendo realizados pelo menos 2 experimentos em triplicata.

4.7 Ensaios de migração em monocamada in vitro

Cerca de 1×10^6 células ressuspendidas em 1 mL de meio DMEM completo foram plaqueadas em placas de 12 poços e mantidas por cerca de 12h, até formarem uma monocamada confluenta. Em seguida, uma área de descontinuidade (“ferida”) foi confeccionada com auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL. Após 3 lavagens com PBS para remoção de debris ou células destacadas, novos meios de cultura contendo DMEM completo mais CHX ou Blue®M foram adicionados nas respectivas IC50, e as células incubadas por 12h. Em todos os experimentos, foram demarcados pontos de referência na parte superior da cobertura da placa, visando a obtenção de fotomicrografias padronizadas das mesmas regiões em 0 e 12h. A migração celular foi analisada com auxílio do *software* ImageJ, por meio da contagem do número de células presentes nas áreas das respectivas feridas. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada condição testada.

4.8 Envio ao Comitê de ética em pesquisa

O presente estudo foi submetido para o devido parecer ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara — UNESP. O número CAAE não foi necessário, pois se trata de pesquisa que utiliza linhagens celulares imortalizadas/permanentes/comerciais, e assim, não é necessário ser submetido a Plataforma Brasil, seguindo a Resolução 466/12, que afirma que é dispensável a apreciação ética nestes casos.

4.9 Análise estatística

As análises de proliferação e citotoxicidade entre os diferentes grupos de tratamento foi realizada por meio de teste T de Student ou Mann-Whitney (dependendo da distribuição dos dados) com auxílio do programa GraphPad InStat

(GraphPad, EUA) considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADO

Conforme descrito na metodologia, as células de linhagem HGF-1 de procedência comercial foram cultivadas nos meios de cultura DMEM (Gibco, EUA) com a suplementação por meio de aminoácidos e antibióticos nas concentrações propostas. Já a linhagem celular de queratinócitos derivados de mucosa bucal humana e naturalmente imortalizada, NOK-SI (CVCL_BW57), foi utilizada como controle na segunda parte do ensaio de proliferação celular, no ensaio de morte celular e na migração em monocamada *in vitro*. Os queratinócitos orais encontravam-se armazenados no laboratório de cultura de celular e de biologia molecular e celular, da instituição.

5.1 Preparo das soluções de CHX e Blue[®]M

Ambos os compostos foram preparados nas seguintes diluições: Para a CHX houve o uso das concentrações 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32, enquanto, que para o Blue[®]M foram usadas as diluições 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128.

5.2 Dose-efeito da CHX e Blue[®]M *in vitro*

O teste de viabilidade celular foi realizado por meio do XTT o qual permitiu a avaliação de viabilidade propriamente dita, a obtenção dos valores de IC₅₀. Para o teste de dose-efeito dos compostos foi realizada uma média das análises, as quais foram obtidas em triplicata, considerando o valor da concentração de ambas as substâncias em 1000, como sendo unidades arbitrárias. Conforme a Tabela 1, a concentração média para a redução de 50% das células (IC₅₀) para a CHX foi de 173.07 ±10.27 e para o Blue[®]M de 43,86 ±3.04. A diluição das substâncias na qual houve o registro do IC₅₀ para a CHX foi 1/8 e para Blue[®]M 1/32.

Tabela 1 — Concentrações em Unidades Arbitrárias para a redução em 50% do número de células viáveis (IC50)

| | IC50 | |
|---------------|-------------------|---------------------------|
| | Clorexidina (ua)* | Blue [®] M (ua)* |
| Experimento 1 | 184,14 | 42,54 |
| Experimento 2 | 163,84 | 41,70 |
| Experimento 3 | 171,25 | 47,35 |
| Triplicata | 173,07 ±10.27 | 43,86 ±3.04 |

* ua = unidade arbitrária; a concentração de cada solução disponibilizada comercialmente foi considerada como de valor igual a 1000 e, a partir desta, 4 diluições da mesma (Clorexidina: 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32; Blue[®]M: 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128) foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade para obtenção do valor médio de cada composto (IC50).

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Ensaio de proliferação celular

O teste de proliferação celular foi dividido em duas partes, sendo a primeira etapa realizada por meio do dispositivo de contagem denominado câmara de Neubauer. A segunda etapa foi realizada por meio do citômetro de fluxo.

Cerca de $3 \cdot 10^4$ células foram plaqueadas somente no meio de cultura (DMEM) ou expostas ao IC50 da CHX e do Blue[®]M, 1/16 e 1/64 respectivamente. Ambas concentrações estão acima do IC50 (1/8 e 1/32) no entanto são proporcionais entre si. O Blue[®]M apresentou numericamente maior contagem celular após 48 horas de contato. Após 2 dias interagindo com o meio celular a CHX apresentou crescimento celular considerável com posterior manutenção dos valores até a análise de 72h conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Curva de proliferação em diferentes substâncias ao longo de 72h

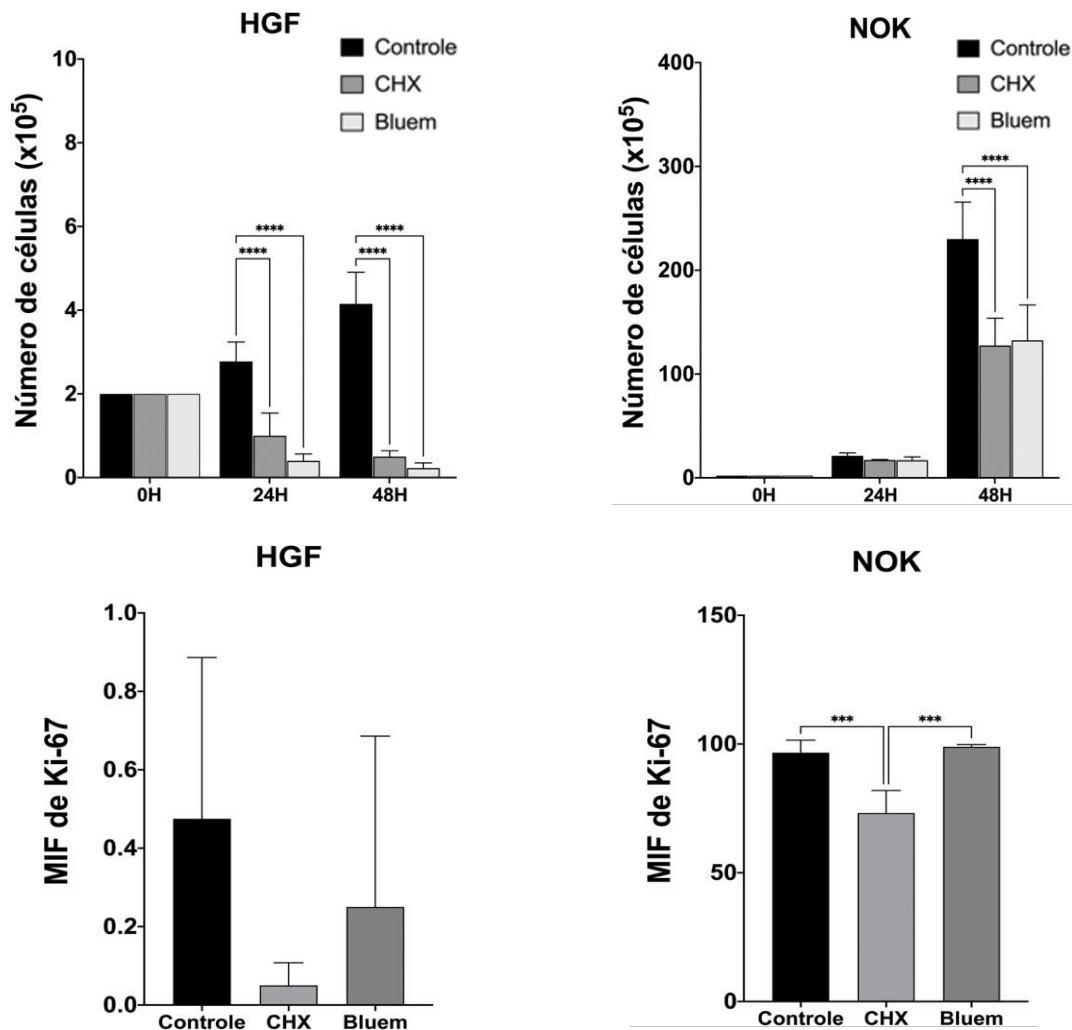
| Substâncias | Tempo | | |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | 24h | 48h | 72h |
| DMEM | 0 | 4×10^4 | 2×10^4 |
| CHX 1/16 | $0,5 \times 10^4$ | $2,25 \times 10^4$ | $2,25 \times 10^4$ |
| BLUE[®]M 1/64 | 1×10^4 | 3×10^4 | 2×10^4 |

Fonte: Elaboração própria.

A segunda parte avaliou a interferência da CHX e Blue[®]M na proliferação de fibroblastos (HGF-1) e queratinócitos (NOK-SI) orais, ensaios proliferativos, incluindo curva de proliferação, índice de marcação com Ki-67 (MIF) e a distribuição das células nas fases do ciclo celular pela marcação com PI, foram realizados. Na figura 1 observa-se a contagem do número de células HGF-1 nos tempos de 24h e 48h, assim como o Ki-67 no período de 24h. O tratamento das células HGF-1 e NOK-SI com CHX e Blue[®]M foi capaz de reduzir significativamente o número de células nos períodos de 24h e 48h. Portanto, o ensaio da curva de proliferação mostrou uma redução de aproximadamente 3 e 8 vezes ($p=0,0006$ e $p<0,0001$, respectivamente) no número de células HGF-1 tratadas com CHX; e redução de 7 e 18 vezes ($p<0,0001$ para ambas) no número de células tratadas com Blue[®]M nos períodos de 24h e 48h, respectivamente. Contudo, não foram observadas variações significantes no índice de marcação com Ki-67. Similarmente, não foi observada diferença relevante na distribuição das fases do ciclo celular entre as células HGF-1 controle e as tratadas com CHX e Blue[®]M (Figuras 2 e 4).

Em contrapartida, as células NOK-SI mostraram uma redução significativa do número de células somente no período de 48h quando tratadas com CHX (~2 vezes, $p=0,003$) e Blue[®]M (~2 vezes, $p=0,005$). Foi notada uma redução significativa da MIF de Ki-67 e acúmulo de células NOK-SI na fase G0/G1 do ciclo celular (Figuras 3 e 4) entre as células NOK-SI tratadas com CHX e o grupo controle e tratadas com Blue[®]M.

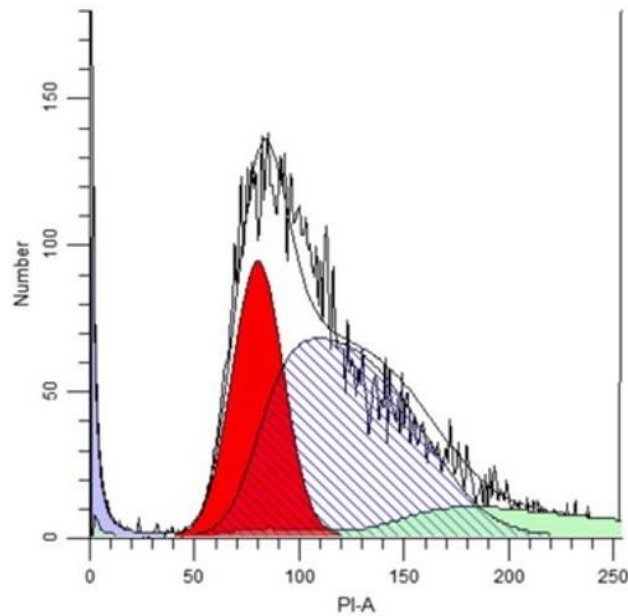
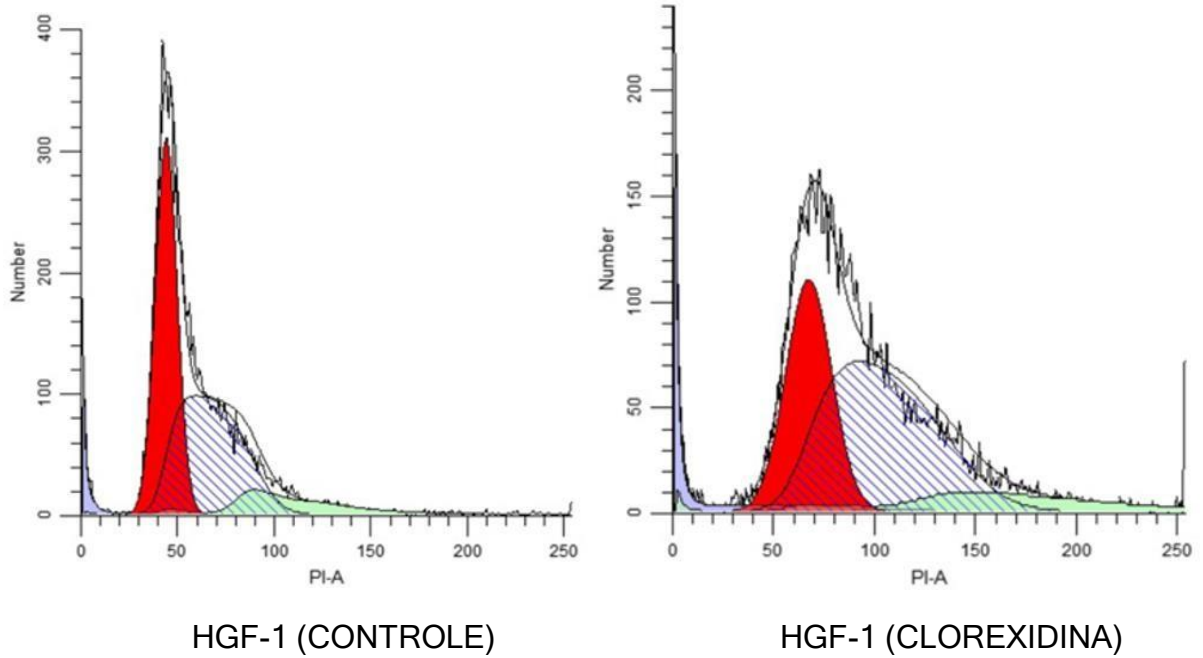
Figura 1 - Efeito da CHX e Blue[®]M sobre a proliferação das linhagens celulares HGF-1 e NOK-SI



Observação. Os gráficos superiores representam a contagem do número de células nos diferentes tempos analisados e os gráficos inferiores mostram os valores expressos por meio da MFI de Ki-67 obtidos para cada linhagem celular na ausência (controle) ou presença das diferentes soluções (CHX e Blue[®]M). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

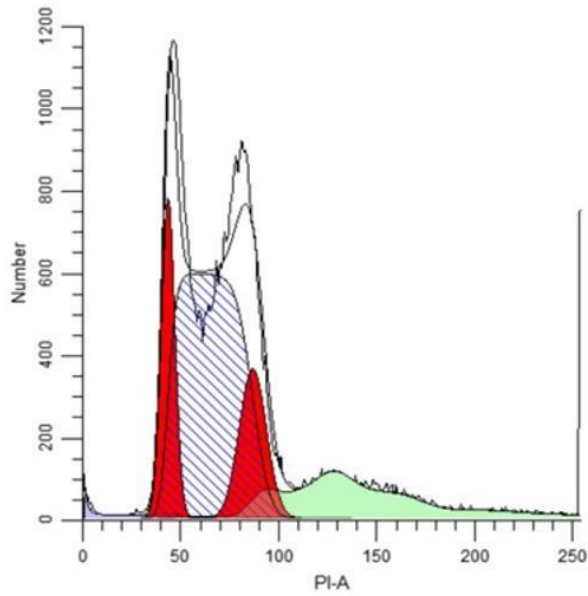
Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Análise do ciclo celular usando coloração com PI nas células HGF-1. Histogramas com o perfil do ciclo celular da célula HGF-1 tratada com CHX ou Blue®Mem 24h

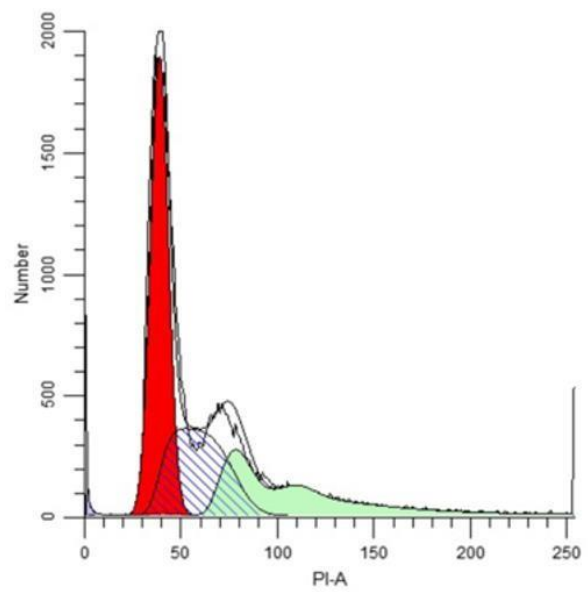


Fonte: Elaboração própria.

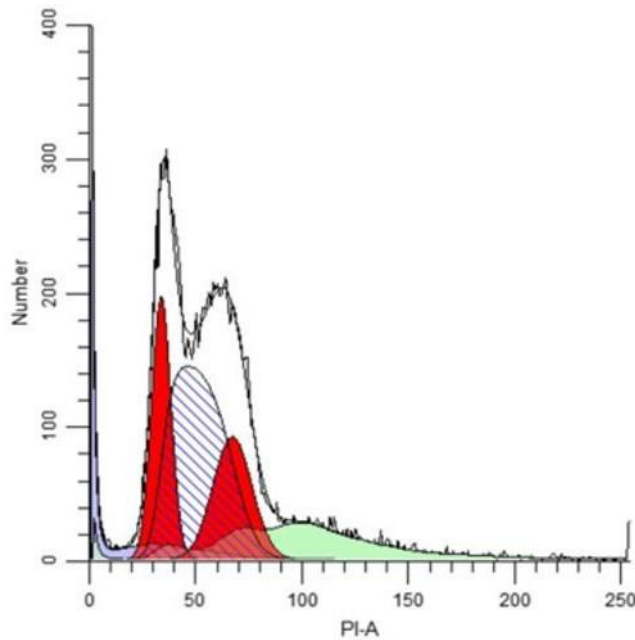
Figura 3 - Análise do ciclo celular usando coloração com PI nas células NOK-SI. Histogramas com o perfil do ciclo celular da célula NOK-SI tratada com CHX ou Blue[®]M em 24h



NOK-SI (CONTROLE)



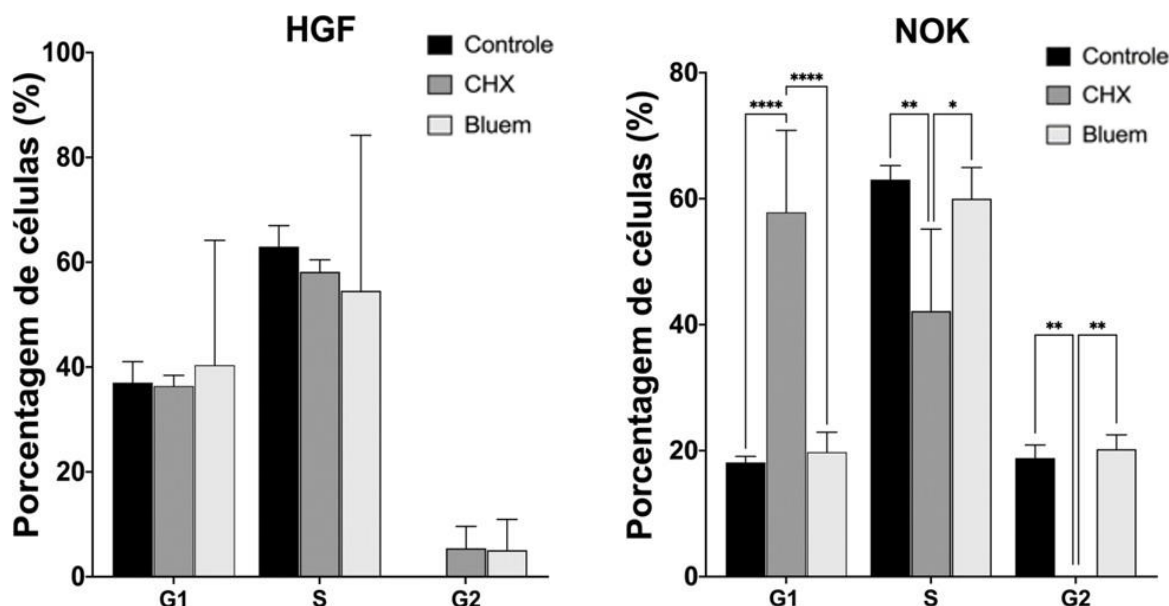
NOK-SI (CLOREXIDINA)



NOK-SI (Blue[®]M)

Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Representação gráfica da porcentagem de células em cada fase do ciclo revelando inibição da proliferação celular da linhagem NOK tratada com CHX



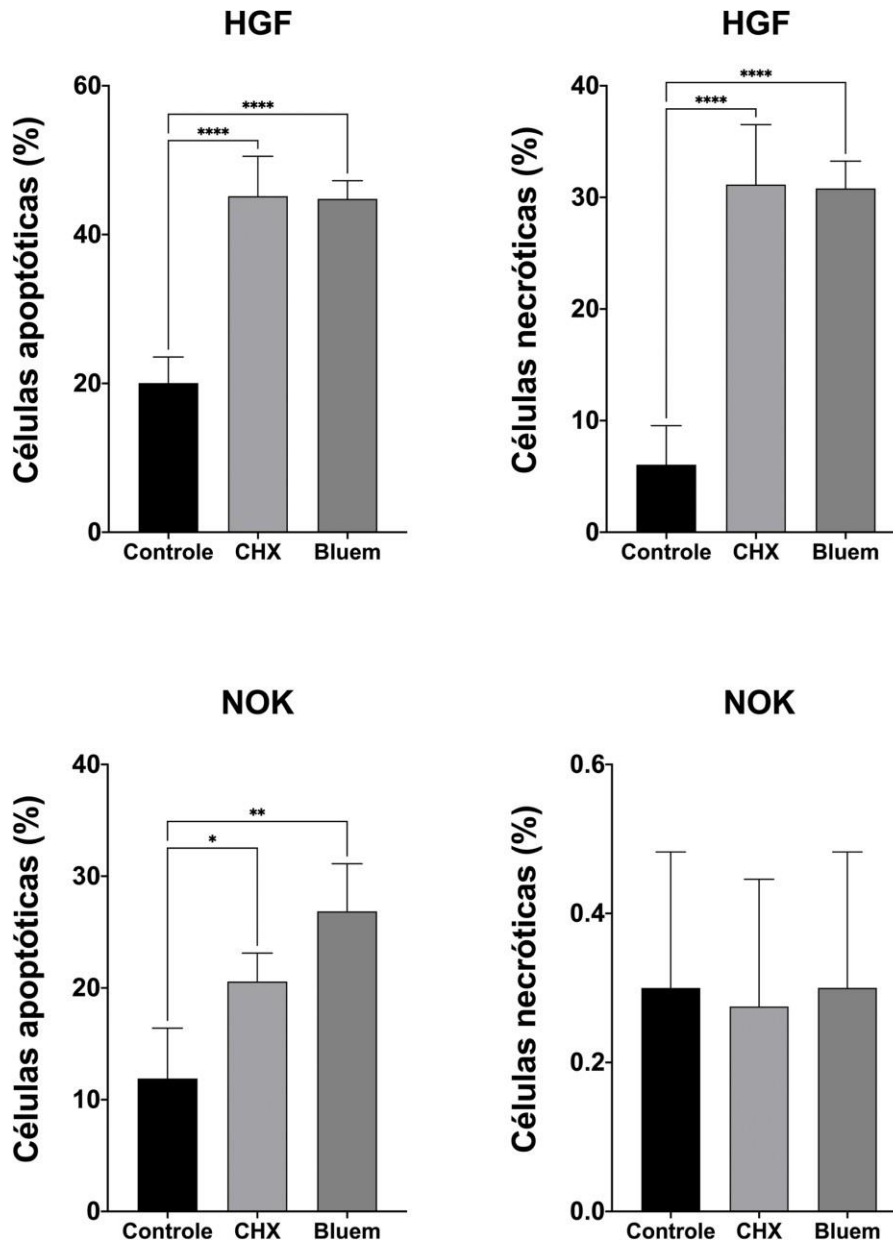
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Morte celular por apoptose e necrose

As taxas de morte celular por apoptose e necrose foram investigadas por duplamarcação com anexina V e 7AAD com posterior detecção por citometria de fluxo. Os resultados revelaram que tanto a CHX quanto o Blue[®]M foram capazes de induzir a morte celular por apoptose (aumento de ~25% para as duas soluções; $p < 0,0001$) e por necrose (aumento de ~25% para as duas soluções; $p < 0,0001$) nas células HGF-1 em um período de 24h em relação ao controle sem tratamento. Resultado semelhante, foi encontrado para as células NOK-SI tratadas com CHX ou Blue[®]M, as quais mostraram um aumento estatisticamente significativo de aproximadamente 10% ($p = 0,02$) e 15% ($p = 0,001$) nas taxas de células apoptóticas, respectivamente, em relação ao controle sem tratamento. Por outro lado, para as células NOK-SI que sofreram necrose, a análise gráfica demonstra que não houve diferença significativa entre o controle e os grupos CHX e Blue[®]M. A figura 5 mostra gráficos das médias das porcentagens de células HGF-1 e NOK-SI positivas para anexina V e 7AAD.

Figura 5 - Determinação dos índices de apoptose e necrose pela marcação com anexina V e 7-AAD



Observação: Exposição das linhagens celulares HGF-1 e NOK-SI à CHX e Blue[®]M por um período de 24 h promoveu morte celular por apoptose.

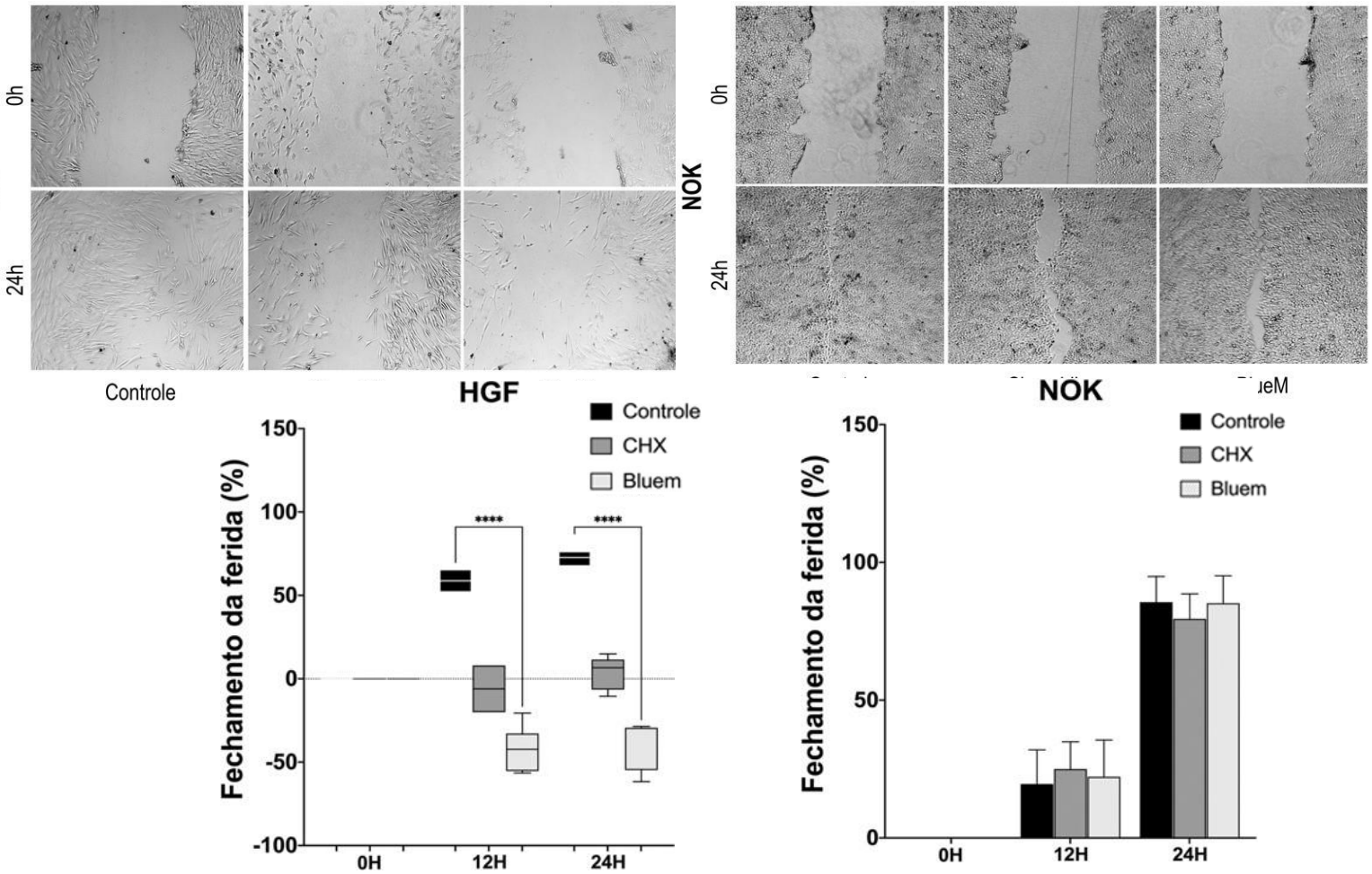
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Elaboração própria.

5.5 Migração celular em monocamada in vitro

A migração celular foi realizada em uma análise comparativa utilizando o método *Scratch Assay* (migração celular em monocamada) para visualizar alterações na capacidade migratória das células HGF-1 e NOK-SI na ausência ou presença de CHX e Blue[®]M. Neste ensaio funcional, foi observado que as células HGF-1 tratadas com Blue[®]M apresentaram redução na capacidade de fechamento da ferida nos tempos de 12h ($p=0,0001$) e 24h ($p=0,0001$). Os resultados do impacto da CHX e Blue[®]M na capacidade migratórias das células HGF-1 e NOK-SI, são observados na Figura 6. Para as células HGF-1 a análise gráfica foi feita por meio da mediana e para as células NOK-SI por meio da média e desvio padrão pois a distribuição dos dados entre os dois grupos foi diferente.

Figura 6 - Ensaio de migração em monocamada para determinação da influência de CHX e Blue[®]M na capacidade migratória das células HGF-1 e NOK-SI



Observação: As figuras localizadas superiormente mostram imagens representativas de cada células nos tempos 0h e 24h, na ausência ou presença de CHX e Blue[®]M. Inferiormente observa-se os gráficos representativos com as médias e medianas da porcentagem das áreas de fechamento de cada situação estudada.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A clorexidina é um composto que vem sendo amplamente utilizado ao longo do tempo, apesar de apresentar certo grau de citotoxicidade. Quando a temática recai sobre reparação tecidual, é possível que a CHX não seja a substância mais efetiva, uma vez que demonstra reduzir a viabilidade celular e a sobrevivência dos fibroblastos, mioblastos, osteoblastos e células endoteliais. Além de bloquear permanentemente a migração celular quando aplicada em concentrações mais elevadas, como por exemplo a 2%⁷. Contudo, do ponto de vista clínico a CHX não parece demonstrar prejuízo significativo quando se considera para uso doses de baixa concentração, como 0,12%, seja na forma de colutório ou gel¹⁰.

O novo composto denominado Blue[®]M, de acordo com o fabricante, contém uma série de benefícios como o favorecimento da angiogênese, controle e prevenção da inflamação, ação bactericida e estímulo ao processo de reparo tecidual.

No entanto, essa substância não apresenta um tempo considerável de utilização clínica e na literatura as evidências se apresentam escassas, principalmente os ensaios clínicos demonstrando sua eficácia, bem como, seu potencial citotóxico. Além disso, os trabalhos se restringem a sua aplicabilidade nos tecidos periodontais e redução do biofilme gengival¹⁹. Dentre a literatura disponível, há autores que advogam que não há evidências suficientes que comprovem os efeitos benéficos do Blue[®]M e nem que este composto seja mais eficaz do que outros produtos de higiene bucal²⁰.

Os resultados do teste in vitro dose-efeito entre os compostos evidenciam que o IC50 da CHX e do Blue[®]M foram 173.07 e 43.86 respectivamente, uma diferença estatisticamente significativa, na qual a CHX precisou de concentração 4 x maior para causar o mesmo efeito ao meio de cultura, ou seja, para a CHX causar a redução de metade da população celular é necessário maior concentração do que o Blue[®]M o qual se mostrou mais citotóxico em menor dose. Cunha et al.¹⁹ em um ensaio clínico randomizado utilizaram o Blue[®]M na forma de creme dental comparando a um dentífrico comercialmente disponível. Após cerca de dezoito semanas de avaliação não foi evidenciada diferença significativa favorável ao Blue[®]M, inclusive a contagem de bactérias mais periodontopatogênicas não foi diferente entre ambos. Embora não tenha sido observado vantagem clínica com o

uso do composto a base de oxigênio reativo, não houve dano gengival ou piora do quadro periodontal, resultados que divergem dos achados nesse estudo. Outro ponto importante é a forma de apresentação, que pode variar de acordo com a indicação clínica. Faz-se necessário ressaltar que o composto na forma de dentifrício não poderia ser utilizado para ensaios em sítios submetidos a enxertos ósseos, uma vez que substâncias detergentes, como o lauril sulfato de sódio, presentes no creme poderiam causar injúria e atraso no reparo, alterando assim a compreensão dos resultados.

Contrariamente Lévesque²¹ identificou num ensaio *in vitro* que a concentração inibitória mínima do Blue[®]M foi de 1% para a apresentação na forma de colutório. Associado a isso, o composto a base de oxigênio ativo apresentou atividade bactericida mais eficaz do que CHX, principalmente em bactérias uni e multicelulares como as causadoras da cárie (*S. mutans*). Além disso tem uma ação maior e mais intensa na destruição dos biofilmes espessos e antigos (+ 72 horas) que geralmente são mais resistentes aos agentes antimicrobianos. Koul et al.²² compararam durante 30 dias o efeito da CHX 0,2% e do Blue[®]M na forma de gel para o tratamento adjuvante da doença periodontal. Embora entre grupos os resultados demonstrem equivalência, na análise intra-grupo o Blue[®]M apresentou redução significativa da unidade formadora de colônia, com melhora da inflamação periodontal. Corroborando com os dados de Lévesque e Niveda & Kaarthikeyan, que evidenciaram redução significativa da profundidade de sondagem após 6 semanas de tratamento com Blue[®]M. Em concordância com os demais autores não houve relatos de dano aos tecidos orais, nem tampouco caráter citotóxico.

Deliberador et al²³ publicaram uma investigação clínica na qual diferentes concentrações de Blue[®]M foram utilizadas (100, 75 e 50%) comparando a CHX 0,12% equivalente a 100%. Os resultados demonstram que concentrações de Blue[®]M no intervalo de 100 e 75% foram equivalentes a dose de CHX em inibir a bactéria *Porphyromonas gingivalis* no ensaio *in vitro*. Dois fatores precisam ser considerados, os autores utilizaram concentrações baseadas possivelmente em diluição, uma vez que comercialmente o Blue[®]M tem apresentação única e por se tratar de um ensaio pré-clínico, não foi possível identificar o possível efeito citotóxico aos fibroblastos e demais linhagens celulares presentes na cavidade oral afim de corroborar ou refutar os achados deste estudo

A primeira metade deste ensaio de proliferação celular revelou que após 24h do plaqueamento, as células no meio de cultura DMEM (controle) não apresentaram crescimento, isso ocorreu possivelmente por alguma falha no processo de tripsinização. Em seguida após 48h e 72h as células voltaram a se proliferar. A substância Blue[®]M apresentou taxas de crescimento celular numericamente diferentes, no entanto não houve um benefício claro em relação a CHX. Saggiaro et al.²⁴ utilizaram de um modelo animal, composto por 20 ratas Wistar, a fim de verificar o reparo ósseo ao associar osso heterógeno a um composto a base de oxigênio ativo (Blue[®]M) em áreas de preservação alveolar. Os animais foram randomizados em dois grupos; no controle (n=10) o alvéolo fresco, da região de incisivo, foi preenchido com osso heterógeno particulado, já no grupo experimental (n=10) o mesmo tipo de biomaterial foi aglutinado por meio do Blue[®]M na forma de gel. Foram realizadas avaliações histológicas no período de 7 e 42 dias de pós-operatório. Contudo, não foram identificados resultados superiores nos alvéolos pertencentes ao grupo experimental. Resultados que corroboram com este estudo, no sentido de não haver um ganho biológico no uso do produto.

Em relação à segunda metade do teste de proliferação celular, que aplicou ambos os compostos nas duas linhagens celulares (HGF-1 e NOK-SI) houve uma redução significativa na contagem de células nos períodos de 24h e 48h. A CHX reduziu até 8x a contagem celular enquanto o Blue[®]M cerca de 18x. Esses dados sugerem a superioridade citotóxica do Blue[®]M em detrimento à CHX, principalmente em células mais susceptíveis como os fibroblastos, os quais apresentam menor tolerância a agressão biológica promovida pelos radicais livres²⁵. Outro fato importante foi o índice de marcação com Ki-67 (que identifica quantas células estão no processo de mitose) e a distribuição das fases do ciclo celular nas células HGF-1, os quais não demonstraram diferenças significantes. Portanto, é possível que a redução no número dos fibroblastos não esteja relacionada com a inibição da proliferação celular, mas sim com a ativação de outros mecanismos inibitórios, como as vias da apoptose²⁶.

Entretanto, as células NOK-SI exibiram redução (cerca de 2x) somente no período de 48h. Essa maior resistência dos queratinócitos pode ser explicado pois as células-tronco residem nas camadas basais do epitélio oral, representando uma

pequena população de células com grande potencial para se auto-renovar e proliferar ao longo de sua vida, além de produzirem queratina que funciona como uma barreira protetora sobre o epitélio²⁷. Diferentemente do observado com o fibroblasto, a redução dos queratinócitos parece estar relacionado com a ativação de mecanismos inibitórios da proliferação celular, fato este confirmado pela análise da marcação com Ki-67 e distribuição das fases do ciclo celular. Foi verificado também uma redução significativa da marcação e acúmulo de queratinócitos na fase G0/G1 do ciclo celular. O acúmulo da linhagem NOK-SI nas primeiras fases do ciclo celular pode ser prejudicial ao reparo, pois as células interrompem o mecanismo de divisão, não concluindo a mitose, prejudicando o reparo tecidual.

Os dados do ensaio de apoptose e necrose revelaram que tanto a CHX como o Blue[®]M foram capazes de induzir a morte celular por ambos os mecanismos, em cerca de 25%, nas células HGF-1 em um período de 24 horas. Em relação aos queratinócitos orais, o Blue[®]M aumentou cerca de 15% a taxa de apoptose. Esses dados corroboram com aqueles obtidos do teste de proliferação, no qual ambos reduziram a contagem celular, sendo o Blue[®]M foi mais citotóxico, inclusive para uma linhagem menos sensível como os queratinócitos.

Aparentemente, o mecanismo que promove a citotoxicidade no Blue[®]M são tempo/concentração dependente. Embora a quantidade do princípio ativo seja um segredo industrial, basicamente o composto em contato com mucosas orais, libera uma quantidade razoável de radicais livres o que resulta na toxicidade sobre as células, principalmente fibroblastos, que sofrem indução de morte celular por apoptose²⁵.

De igual modo, a clorexidina apresentou alta indução aos mecanismos apoptóticos para ambas as linhagens celulares além de causar necrose aos fibroblastos, células cruciais para a síntese de colágeno. Evidência que corrobora com as informações disponíveis sobre o potencial de citotoxicidade celular da CHX^{6,3,7}.

Dados como esse certamente poderiam questionar o uso de ambos os compostos como favorecedores do reparo tecidual. No qual a grande demanda proliferativa e migratória de células pode não ser atendida, inviabilizando o fechamento da ferida cirúrgica².

Por fim, no ensaio de migração celular²⁸ foi observado que as células HGF-1

eram mais sensíveis ao efeito do Blue[®]M, ao apresentaram maior redução na capacidade de fechamento do *Scratch* em até 24h quando comparadas ao grupo controle e CHX. Por outro lado, os queratinócitos concluíram a migração celular, mesmo em presença do Blue[®]M, dentro de 24 horas. De acordo com os dados desse estudo, o Blue[®]M parece influenciar expressivamente a proliferação dos queratinócitos ao invés da sua migração; nesse contexto as células continuam a migrar ao local a ser reparado, mas com seu potencial de divisão celular comprometido, o que interfere no reparo tecidual, uma vez que a disponibilidade de células é baixa. Provavelmente outro argumento que pode contribuir no entendimento da maior resistência a compostos citotóxicos, recai ao fato de que a linhagem NOK-SI não é constituída apenas de células estruturais, mas também exercem importantes funções imunológicas, como atuar no processo de inflamação crônica de feridas²⁹.

No entanto, é preciso ter cautela ao se interpretar os resultados apresentados, uma vez que a concentração comercial do composto Blue[®]M não é conhecida. Além das limitações impostas pelos estudos in-vitro. Para padronização os grupos foram equiparados a uma mesma unidade arbitrária: 1000ua para que as diluições estivessem em proporção, mas não existe garantia de que a mesma dose foi usada em ambas. Além disso os dados disponíveis na literatura variam em forma de apresentação e estão essencialmente relacionados ao controle da doença periodontal e não do reparo tecidual após procedimentos regenerativos.

Contudo, nossos dados questionam o potencial favorecimento do reparo tecidual promovido por este novo composto. Novos ensaios laboratoriais e clínicos devem ser encorajados para investigar em demais linhagens celulares, detalhes sobre os mecanismos que favorecem a citotoxicidade do Blue[®]M.

7 CONCLUSÃO

Considerando as limitações deste ensaio in-vitro, foi possível afirmar que tanto a clorexidina quanto o Blue[®]M demonstraram potencial de citotoxicidade celular. Além disso, o Blue[®]M evidenciou maior potencial citotóxico do que a clorexidina, demonstrado por menor IC50, pela redução significativa da proliferação celular, além do aumento das apoptoses e necrose celular. Interferindo substancialmente na migração de fibroblastos.

REFERÊNCIAS*

- 1 Carneiro J, Junqueira LC. *Histologia básica: texto e atlas*. 13th ed. Rio de Janeiro: Koogan, Guanabara; 2017.
- 2 Dalton SJ, Whiting CV, Bailey JR, Mitchell DC, Tarlton JF. Mechanisms of chronic skin ulceration linking lactate, transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor, collagen remodeling, collagen stability, and defective angiogenesis. *J Invest Dermatol*. 2007; 127(4): 958–68.
- 3 Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine: pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(7): 1321–26.
- 4 Coelho AS, Laranjo M, Gonçalves AC, Paula A, Paulo S, Abrantes AM et al. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. *Odontology*. 2019; 109: 260-70. doi:10.1007/s10266-019-00465-z.
- 5 Mercan U, Gonen ZB, Salkin H, Yalcin-Ulker GM, Meral DG. Comparison of the effect of postoperative care agents on human gingival fibroblasts: a preliminary study. *Eur Oral Res*. 2019; 53(2): 67-73. doi:10.26650/eor.20197456.
- 6 Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol Vitr*. 2008; 22(2): 308–17.
- 7 Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Jt Infect*. 2018; 3(4): 165–72.
- 8 Tsourounakis I, Palaiologou-Gallis AA, Stoute D, Maney P, Lallier TE. Effect of essential oil and chlorhexidine mouthwashes on gingival fibroblast survival and migration. *J Periodontol*. 2013; 84(8): 1211–20.
- 9 Daood U, Yiu CKY. Transdental cytotoxicity and macrophage phenotype of a novel quaternary ammonium silane cavity disinfectant. *Dent Mater*. 2019; 35(2): 206–16.
- 10 Pellegrino G, Lizio G, Corinaldesi G, Marchetti C. Titanium Mesh Technique in rehabilitation of totally edentulous atrophic maxillae: a retrospective case series. *J Periodontol*. 2016; 87(5): 519–28.
- 11 Lizio G, Mazzone N, Corinaldesi G, Marchetti C. Reconstruction of extended and morphologically varied alveolar ridge defects with the titanium mesh technique: clinical and dental implants outcomes. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016; 36(5): 689–97.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- 12 Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 2009; 29(4): 646–82.
- 13 Brozoski MA, Lemos CA, Naclério-Homem MDG, Deboni MCZ. Adjuvant aqueous ozone in the treatment of bisphosphonate induced necrosis of the jaws: report of two cases and long-term follow-up. *Minerva Stomatol.* 2014; 63(1-2): 35–41.
- 14 Martelli F, Nunes FMF. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Cienc Cult.* 2014; 66(3): 54–7.
- 15 Laçin N, İzol BS, Gökalp Özkorkmaz E, Deveci B, Deveci E. Effects of alloplastic graft material combined with a topical ozone application on calvarial bone defects in rats. *Folia Morphol (Warsz).* 2020; 79(3): 528-47.
- 16 Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith N et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res.* 2019; 9(3): 161-7.
- 17 Ozdemir H, Toker H, Balci H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2013; 48(6): 722–26.
- 18 Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras.* 1997; 43(1): 61–8.
- 19 Cunha EJ, Auersvald CM, Deliberador TM, Gonzaga CC, Esteban Florez FL, Correr GM et al. Effects of active oxygen toothpaste in supragingival biofilm reduction: a randomized controlled clinical trial. *Int J Dent.* 2019 Jul; 2019: 3938214.
- 20 Hollaar VRY. How effective is Blue®m? *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 2020; 127(2): 79–82.
- 21 Masadeh MM, Gharaibeh SF, Alzoubi KH, Al-Azzam SI, Obeidat WM. Antimicrobial activity of common mouthwash solutions on multidrug-resistance bacterial biofilms. *J Clin Med Res.* 2013 Oct; 5(5): 389-94.
- 22 Koul A, Kabra R, Chopra R, Sharma N, Sekhar V. Comparative evaluation of oxygen releasing formula (Blue-M Gel®) and chlorhexidine gel as an adjunct with scaling and root planing in the management of patients with chronic periodontitis: a clinico- microbiological study. *J Dent Spec.* 2020; 7(2): 111–17.
- 23 Deliberador TM, Weiss SG, Rychuv F, Cordeiro G, Cate MCL Ten, Leonardi L et al. Comparative analysis in vitro of the application of blue oral gel versus chlorhexidine on porphyromonas gingivalis: a pilot study. *Adv Microbiol.* 2020; 10(4): 194–201.
- 24 Saggiaro C, Sartoretto S, Duarte I, Alves A, Barreto H, Resende R et al. In vivo evaluation of bovine xenograft associated with oxygen therapy in alveolar bone repair. *J Oral Implantol.* 2021 Dec 1; 47(6): 465-71.

- 25 Gutiérrez-Venegas G, Guadarrama-Solís A, Muñoz-Seca C, Arreguín-Cano JA. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(12): 15563–72.
- 26 Faria G, Cardoso CRB, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: a role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 234(2): 256–65.
- 27 Calenic B, Greabu M, Caruntu C, Tanase C, Battino M. Oral keratinocyte stem/progenitor cells: specific markers, molecular signaling pathways and potential uses. *Periodontol 2000*. 2015; 69(1): 68–82.
- 28 Martinotti S, Ranzato E. Scratch wound healing assay. *Methods Mol Biol*. 2020; 2109: 225–9.
- 29 Piipponen M, Li D, Landén NX. The immune functions of keratinocytes in skin woundhealing. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(22): 1–26.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO RELATORIO FINAL

SAGe - Sistema de Apoio a Gestão

15/02/2022 21:32



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

| | |
|----------------------------------|--|
| Processo | 2019/26431-4 |
| Linha de Fomento | Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo |
| Situação | Em Execução |
| Vigência | 01/09/2020 a 31/08/2021 |
| Beneficiário | Gustavo D'Angieri Saugo |
| Responsável | Valfrido Antonio Pereira Filho |
| Vínculo | |
| Institucional do Processo | Faculdade de Odontologia de Araraquara/FOAR/UNESP |
| Título | Comparação entre a citotoxicidade da clorexidina e do BlueM® quando aplicados a uma linhagem celular de fibroblasto gengival humano (HGF-1): Estudo in vitro |

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em : 27/01/2022

Objetos de análise

| Objeto de análise | Data de Submissão | Resultado |
|------------------------|-------------------|-----------|
| Relatório Científico 2 | 03/12/2021 | Aprovado |

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem.

Para visualizar o despacho, por favor, acesse o Sistema SAGe (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.

Atenciosamente,
Luiz Eugênio A. M. Mello
Diretor Científico

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável

Parecer do Relatório Científico

Por favor, emita o parecer, comentários, críticas e sugestões.

O relatório científico apresentado está bem redigido, conciso e apresenta de maneira clara e objetiva os resultados obtidos. Sugiro apresentar os resultados referentes à obtenção do IC50 na forma de gráfico com a curva dose-resposta e porcentagem de células positivas para Ki-67 ao invés de intensidade média de fluorescência. Os resultados mostram citotoxicidade do composto Blue M por meio de diferentes métodos in vitro, com potencial implicação na prática clínica.

Avaliação

Para Relatório FINAL

Em relação à proposta inicial os resultados obtidos estão:

- Acima das expectativas
- Dentro das expectativas
- Aquém das expectativas
- Muito aquém das expectativas

Observações que julgar pertinentes

Todos os objetivos propostos do projeto foram realizados e os resultados estão bem descritos.

Reserva Técnica

A FAPESP permite a utilização dos recursos da Reserva Técnica (RT) sem prévia avaliação pela assessoria. Avalie a adequada aplicação desses recursos, considerando os objetivos científicos do projeto. Ressaltamos que a utilização destes recursos será objeto de análise na Prestação de Contas.

A reserva técnica foi utilizada para aquisição do reagente BlueM e pagamento do serviço de citometria de fluxo.

Opine sobre a adequação dos novos itens solicitados, face às reais necessidades do projeto.

Não se aplica.

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 2 (Aprovado)

| | |
|----------------------------|-------------------------|
| Compromisso | 10/12/2021 |
| Período Relacionado | 10/02/2021 a 31/08/2021 |
| Situação | Atendido |