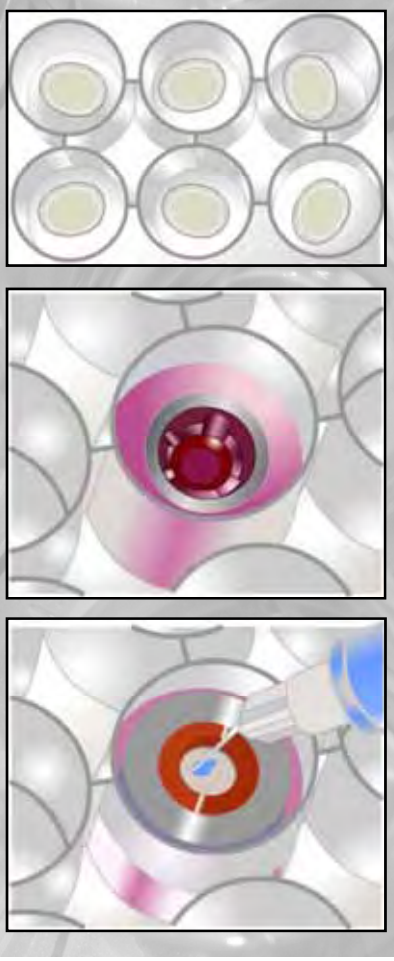
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

FERNANDA CAMPOS ROSETTI LESSA

CITOTOXICIDADE DIRETA E TRANSDENTINÁRIA DA CLOREXIDINA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES MDPC-23 E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO



Araraquara
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

FERNANDA CAMPOS ROSETTI LESSA

CITOTOXICIDADE DIRETA E TRANSDENTINÁRIA DA CLOREXIDINA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES MDPC-23 E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Doutor em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2008

Lessa, Fernanda Campos Rosetti.
Citotoxicidade direta e transdentinária da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23 e análise de sua atividade antibacteriana in vitro / Fernanda Campos Rosetti Lessa. – Araraquara: [s.n.], 2008.
127 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Citotoxicidade 2. Clorexidina 3. Odontoblastos 4. Streptococcus mutans I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, CRB-8/4612
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

FERNANDA CAMPOS ROSETTI LESSA

CITOTOXICIDADE DIRETA E TRANSDENTINÁRIA DA CLOREXIDINA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES MDPC-23 E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

3º Examinador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

4º Examinador: Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto

5º Examinador: Prof. Dr. Mario Fernando de Góes

Araraquara, 18 de agosto de 2008.

DADOS CURRICULARES

FERNANDA CAMPOS ROSETTI LESSA

NASCIMENTO	23/01/1978 – Vitória – ES
FILIAÇÃO	Fernando Antonio Bresciani Rosetti Maria Beatriz Campos Rosetti
1997-2001	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Campos - RJ
2001-2003	Especialização em Odontopediatria Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – Regional de São Carlos/São Paulo.
2003-2005	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP
2005-2008	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – FOAr/UNESP

ORAÇÃO DA PAZ

Senhor! Fazei de mim um instrumento da vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor.
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.
Onde houver discórdia, que eu leve a união.
Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.
Onde houver erro, que eu leve a verdade.
Onde houver desespero, que eu leve a esperança.
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.
Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, fazei que eu procure mais:
consolar, que ser consolado;
compreender, que ser compreendido;
amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe.
É perdoando que se é perdoado.
E é morrendo que se vive para a vida eterna.

São Francisco de Assis

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus,

Por estar presente em todos os dias da minha vida, guiando meus passos e iluminado meu caminho. ***Ao meu anjo da guarda****, por estar sempre ao meu lado, me protegendo e me dando força.*

Ao meu marido Rodrigo Azevedo Lessa (MÔ),

"Você é a escada da minha subida
Você é o amor da minha vida
É o meu abrir de olhos do amanhecer
Verdade que me leva a viver
Você é a espera na janela
A ave que vem de longe tão bela
A esperança que arde em calor
Você é a tradução do que é o amor".

Blanch

Obrigada pelo amor, paciência, respeito, confiança, incentivo e cumplicidade. A certeza do seu apoio e compreensão me manteve firme nesta caminhada. Agradeço muito a Deus por ter colocado você na minha vida. Te amo muito!!!

À minha mãe Maria Beatriz Campos Rosetti,

Faltam-me palavras para expressar todo meu amor e gratidão, por tantas demonstrações de incentivos, renúncias, carinho, dedicação, respeito às minhas escolhas, nunca medindo esforços para que os meus sonhos se realizassem. Sua determinação, garra, honestidade e respeito ao próximo são exemplos a serem seguidos. Amo a senhora incondicionalmente!

Ao meu pai Fernando Antônio Bresciane Rosetti,

"Guarde os bons pensamentos durante toda a sua vida e cultive este jardim de energias positivas e bons sentimentos para que sua vida seja sempre florida e de muita paixão. Algumas plantas do seu jardim poderão murchar e morrer, porém as demais vão recobri-las e depois usá-las como adubo para crescer mais belas e fortes".

Obrigada por ter me criado num lar harmonioso, com muito amor.

Aos meus irmãos Christian Campos Rosetti e Grazzielle Campos Rosetti,

Por sempre caminharmos juntos, nos amando e respeitando. Vocês são e sempre serão meus melhores amigos! Não posso imaginar minha vida sem vocês! Obrigada pelo carinho, respeito, amizade e pela constante torcida. Vocês me completam!

À minha querida vozinha, Consuelo Mendes Campos,

Pelas inúmeras demonstrações de bondade, bom humor e sabedoria! O que seria de mim sem seu carinho, sua atenção e seus puxões de orelha? A senhora é muito importante na minha vida! Te amo muito!!!

Ao meu querido vozinho, Raphael Sampaio Campos (in memorian),

Pelo exemplo de honestidade, paciência e amor. A saudade é imensa, mas a certeza de ter o senhor ao meu lado aquece meu coração.

À minha tia Fabíola Cavalini Pinto,

Minha querida tia, minha segunda mãe, certeza de um porto seguro. Por todo amor e incentivo. Obrigada pelo apoio a minha família nos momentos difíceis.

Ao meu afilhado Gabriel Haddad de Lima Andrade,

Você é um anjo que entrou na minha vida! É impossível ficar ao seu lado e não sentir a alegria que emana de você. Te amo muito!

ESSA CONQUISTA É NOSSA!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, *professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, meu orientador,*

"Um pesquisador sem laboratório, é como um soldado sem armas na guerra".
Louis Pasteur

Beto, obrigada pela ótima convivência, compreensão e amizade. Obrigada por ter me acolhido de forma tão carinhosa e por nunca ter medido esforços para me ajudar. Por todas as valiosas contribuições para o meu aprimoramento científico e humano. Pelo seu exemplo de sabedoria, dedicação, seriedade e competência no desenvolvimento da pesquisa científica, sempre me incentivando a refletir, questionar e ter senso crítico dentro desse universo. Pela convivência enriquecedora do dia-dia e inúmeras oportunidades que me proporcionou, as quais estimularam meu crescimento. Obrigada por sempre confiar, incentivar, e acreditar em mim. Minha eterna admiração e gratidão!

As amigas e irmãs do coração Aline Cavalcanti Viana, Andreza Maria Fábio Aranha, Ângela Líbia Chagas Amaral, Carolina Paes Torres Mantovani, Fernanda de Oliveira Bello Corrêa, Giuliana Tavares Civiero, Indri Nogueira, Lícia Bezerra Cavalcante, Lívia Haddad de Lima, Sabrina de Araújo Tinoco e Yeon Jung Kim

"Um amigo é uma alma em dois corações".
Aristóteles

A amizade é a verdadeira riqueza da vida. Sou muito grata a Deus por ter me presenteado com tantas amigas. Obrigada pelas inúmeras demonstrações de companheirismo, pelos momentos felizes e apoio nos momentos difíceis. Muitas de vocês abriram seus lares e me fizeram sentir mais querida. Independente da distância que nos separa vocês sempre estarão no meu coração. Amo vocês!

Amigas queridas, vocês jamais serão esquecidas!

Às famílias Rosetti, Bresciane, Lessa e Cavalini,

Mesmo distante, sei que sempre torceram por mim. Obrigada por tudo!!!

Ao meu sogro Luiz Carlos Lessa, *sinônimo de profissionalismo e* ***minha sogra Maria Silvia Lessa,*** *ser humano extremamente dedicado à família, que ajudou na minha ausência junto ao meu marido.*

À Luiz Carlos Lessa Junior, Denise B. P. Lessa, *meus sobrinhos* ***Luiz Henrique P. Lessa e Eduardo P. Lessa,***

Muito obrigada por terem me apoiado e torcido por mim. Estou muito feliz em poder compartilhar esta vitória com vocês!

To my Canadian family, the Burghardts

Thank you very much for all the support and for making me feel loved as a true blood daughter and sister. XOXO

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, *na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. José Claudio Martins Segalla e sua Vice-Diretora, Profa. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon.*

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, representados pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon e pela Vice-Chefe Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins.*

À Coordenação do Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, representadas pela coordenadora Profa. Dra. Josimeri Hebling e pelo Vice-coordenador Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, *pela concessão da bolsa de estudos de doutorado e* ***ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*** *pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.*

À Profa. Dra. Josimeri Hebling, *professora da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Pela amizade, paciência, auxílio constante em todos os momentos, ensinamentos transmitidos, e, sobretudo, pelo privilégio da sua convivência. Sua honestidade e dedicação à pesquisa é incentivadora. Obrigada pelas sugestões e gentileza durante a análise estatística deste trabalho.

À Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro*, professora da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Obrigada pela convivência, carinho, companheirismo, orientação e amizade. Por ter me acompanhado neste trabalho, por sua presteza e apoio. Você é uma pessoa muito querida!

Ao Prof. Dr. Fabio César Braga de Abreu e Lima, *professor da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Pela amizade, convivência e carinho com que sempre me tratou.

À Profa. Dra. Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto, *professora da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Obrigada por todo o carinho, incentivo e amizade. Obrigada por manter suas portas sempre abertas e dividir um pouco do seu conhecimento comigo. Sou imensamente grata por tudo o que você fez por mim.

Ao Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, *professor da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Pela convivência, pelos momentos de descontração e pela amizade.

À Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon, *professora da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Pela convivência, carinho e exemplo de superação.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, *professora da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Pela forma gentil e afetuosa com que sempre me recebeu.

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, *professora da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,*

Por ter me acolhido em seu laboratório de forma tão carinhosa.

*Aos colegas da minha turma de Doutorado em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista****, Andreza Maria Fabio Aranha, Érika Botelho Josgrilberg, Fabio Luiz Ferreira Scanavino, Hermes Pretel, Jonas de Almeida Rodrigues, Junia Carolina Linhares Ferrari dos Santos, Luciana Monti Lima, Mariane Emi Sanabe e Murilo de Sousa Guimarães****, e aos colegas das outras turmas de pós-graduação em Odontopediatria,* ***Ana Luisa Botta Martins de Oliveira, Camila Fávero de Oliveira, Cármen Regina Coldebella, Elcilaine Rizzato Azevedo, Herica Adad Ricci, Indri Nogueira, Juliana Oliveira Gondim, Licia Bezerra Cavalcante,***

Michele Baffi Diniz, Márcia Tanaka, Nancy Tomoko Sacono e Simone di Salvo Mastrantonio, *juntos na busca de um mesmo ideal, pelo companheirismo e convivência agradável ao longo de todo curso.*

Aos meus companheiros do laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais ***Adriano Augusto M. de Mendonça, Adriano Fonseca de Lima, Ana Paula Dias Ribeiro, Andreza Almeida, Andreza Maria Fabio Aranha, Camila Fávero de Oliveira, Cármen Regina Coldebella, Carolina B. Brito, Castelo Pedro V. Cidade, Cláudia Huck, Daniela Cristina Barbosa, Darlon Martins, Fernanda da Silveira Vargas, Flávia Cristina Coimbra, Flávia Zardo Trindade, Gislaine C. Padovani, Indri Nogueira, João F. Kina, Juliana Oliveira Gondim, Juliana Pirola Garcia, Karina A. Neves, Keren C. F. Jordão, Lorena Brito de Souza, Luciana Rocha Coimbra, Marcela Tagliani, Maria da Glória Vieira Celli, Nancy Tomoko Sacono, Patrícia Gonçalves Frederico e Pedro Paulo Chaves de Souza,*** *pelos momentos de alegria que vivemos no laboratório e pelo prazer de aprendermos juntos.*

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, da Biblioteca, do Departamento de Clinica Infantil, do Departamento de Fisiologia e Patologia e da Portaria.

Obrigada pelos sorrisos, carinho e dedicação. Com certeza os dias ficam mais agradáveis com vocês por perto!

Às queridas amigas de Araraquara, Ana Paula Dias Ribeiro, Carolina Pawloski, Dulce Helena Oliveira, Elizandra Veríssimo Botta, Flávia Zardo Trindade, Juliana Lupo, Juliana Oliveira Gondim, Juliana Pirola Garcia, Luciana Monti Lima, Márcia Tanaka, Mariane Emi Sanabe, Marina Scabello, Michele Baffi Diniz e Nancy Tomoko Sacono,

Pela forma tão carinhosa com que sempre me trataram, pela amizade e esforço para tornar a minha estadia em Araraquara, a mais agradável possível, minimizando as saudades proporcionadas pela distância. Obrigada por tantas e tão generosas demonstrações de companheirismo.

Aos amigos Andreza Maria Fábio Aranha, Cláudia Huck, Cláudio Lessa, Fernanda Vargas, Indri Nogueira, Juliana Gondim, Rafael Gonçalves Azeredo e Sonia Vargas*, pela ajuda essencial na realização desse projeto.*

Aos amigos e amigas de Vitória, Alice Almeida Martins de Andrade, Fernanda Abrantes, Luiz Antonio Monteiro Cruz Junior, Luiz Augusto e Ana Karina Bellini, Juliana Machado Barroso e Rafael Gonçalves Azeredo,

Muito obrigada pela torcida, pelas risadas, companheirismo, apoio, dedicação e incentivo. A amizade de vocês significa muito pra mim!

À querida Maria Salete Fábio Aranha

Obrigada pelo apoio, carinho, disponibilidade e aprendizado. Por todos os momentos de alegrias que compartilhamos e pelas dificuldades divididas. Você é muito importante para mim!

À Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,

Cris, muito obrigada pela sua amizade, incentivo e por estar sempre disposta a me ajudar. Você é uma pessoa maravilhosa!

Aos queridos e inesquecíveis amigos de Ribeirão Preto, Andréa Soares de Oliveira Ortolan Di Sério, Carolina Paes Torres Mantovani e família, Elizete Nicolau, Fátima Rizóli, Gisele Faria, Jaciara Silva, Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira, Maria Cristina Borsatto, Marta Contente, Michelle Alexandra Chinelatti, Renata Pereira Ramos, Ricardo Zaratin Mantovani e Rodrigo Galo,

Vocês estarão eternamente no meu coração. Obrigada por todos os momentos felizes, amizade, apoio e cumplicidade. Amo vocês!

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social e do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo*, pela atenção, amizade, orientação e ensinamentos que recebi.*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desse sonho. ***Muito obrigada!!!***

PREFÁCIO

Esta tese será apresentada na forma de três artigos intitulados:

Artigo 1 – "**Avaliação da toxicidade da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23" –** Será submetido para publicação no *Journal of Materials Science. Material in Medicine.*

Artigo 2 – "**Toxicidade transdentinária da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23" –** Será submetido para publicação no *Journal of Biomedical Materials Research Part B.*

Artigo 3 – "**Avaliação in vitro da atividade antibacteriana direta e transdentinária da clorexidina" –** Será submetido para publicação no *International Endodontic Journal.*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS 14
RESUMO 15
ABSTRACT 16
INTRODUÇÃO 19
PROPOSIÇÃO 26
ARTIGO 1 – "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CLOREXIDINA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES MDPC-23 28
ARTIGO 2 – "TOXICIDADE TRANSDENTINÁRIA DA CLOREXIDINA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES MDPC-23 57
ARTIGO 3 – "AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DIRETA E TRANSDENTINÁRIA DA CLOREXIDINA 88
CONSIDERAÇÕES FINAIS 114
CONCLUSÃO 120
REFERÊNCIAS 122

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI – Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
CHX – Chlorhexidine (clorexidina)
DNA – ácido desoxiribonucléico
EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético
ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (teste imunoenzimático)
HCl – ácido clorídrico
MDPC-23 – Mouse Dental Papillae Cell -23 (célula da papila dentária de camundongos -23)
MMPs - metaloproteinases da matriz
MTT – metiltetrazolium
PBS – Phosphated buffer saline (Solução salina fosfatada tamponada)
FBS – Fetal bovine serum (soro fetal bovino)
SDH – desidrogenase succínica
UFC – unidades formadoras de colônia
ºC – grau Celsius
p – nível de significância estatística
pH – potencial hidrogeniônico
% – porcentagem

Lessa FCR. Citotoxicidade direta e transdentinária da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23 e análise de sua atividade antibacteriana in vitro [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito citotóxico direto e transdentinário de diferentes concentrações de clorexidina (CHX), bem como sua atividade antibacteriana. Para isto, concentrações de 0,06%; 0,12%; 0,2%; 1% e 2% de CHX foram aplicadas sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura (teste direto). Além disto, as concentrações de CHX também foram aplicadas sobre a superfície oclusal de discos de dentina de 0,5mm ou 0,2mm de espessura, os quais apresentavam células MDPC-23 cultivadas sobre sua superfície pulpar (teste indireto). O metabolismo e morfologia celular foram avaliados pelo teste de MTT e pela análise em MEV, respectivamente. O potencial antibacteriano da CHX foi avaliado sobre *S.mutans* com e sem interposição de discos de dentina. Os dados numéricos obtidos dos experimentos realizados foram submetidos à análise estatística. A redução do metabolismo celular provocado pela CHX mostrou-se dose e tempo dependentes. Foi demonstrado ainda que quanto menor a espessura do disco de dentina e maior a concentração da CHX, mais intensos são os efeitos tóxicos deste agente químico sobre as células pulpares em cultura, e mais efetiva é a atividade antibacteriana da CHX sobre *S.mutans.* Foi possível concluir que o intenso efeito tóxico direto observado para a CHX é notavelmente reduzido pela interposição de barreiras de dentina, cuja espessura interfere no metabolismo das células pulpares MDPC-23. Além disso, a CHX difunde através dos túbulos dentinários exercendo efeito antibacteriano contra *S.mutans*.

Palavras-chave: Citotoxicidade; clorexidina; odontoblastos; Streptococcus mutans

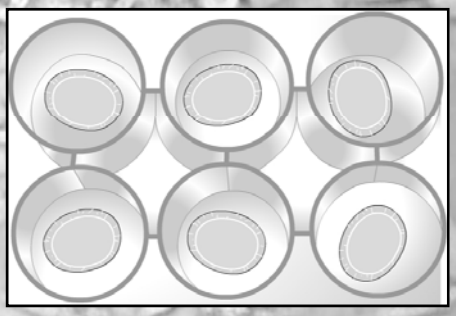
Lessa FCR. Direct and transdentinal toxicity of chlorhexidine on odontoblast cell line MDPC-23 and its antibacterial activity [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

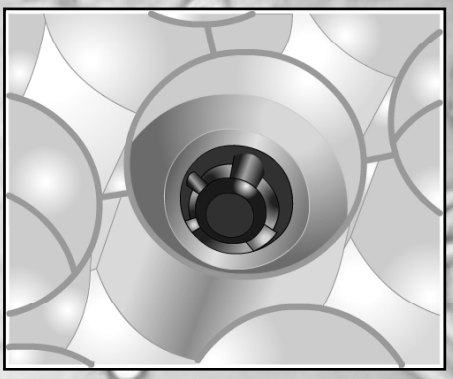
Abstract

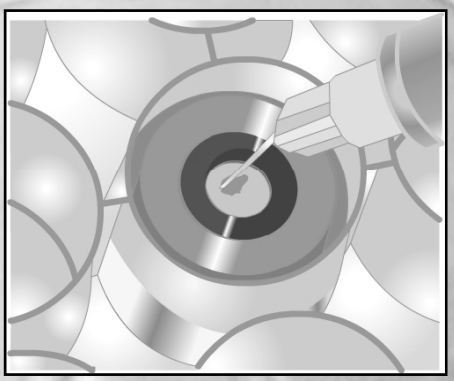
The aim of this in vitro study was to evaluate the direct and transdentinal cytotoxicity of different concentrations of chlorhexidine (CHX) and its antibacterial activity. The following concentrations of CHX: 0.06%; 0.12%; 0.2%; 1%; and 2% were applied directly on odontoblast-cell line MDPC-23 or on the occlusal surface of dentin discs (0.5mm or 0.2mm thick) which presented pulp cells seeded on their pulpal surface. Cell metabolic activity and morphology were evaluated by MTT assay and SEM, respectively. The influence of dentin thickness on the antibacterial activity of CHX against *S. mutans* was also assessed. The data were submitted to the statistical analysis of Mann-Whitney. Reduction in the cell metabolism from 42% to 78% was observed according to the concentration of CHX and its period of application on the cells. Therefore, the direct cytotoxicity of CHX is dose and time dependent. It was also observed that the most intense toxic effects occurred as thicker was the dentin disc and as higher was the concentration of CHX. Antibacterial activity against *S. mutans* was observed to the highest concentration of CHX. It was concluded that the intense cytotoxicity of all concentrations of CHX applied directly on the MDPC-23 cells is notably reduced by the presence of dentin discs interposed between this chemical agent and the cultured cells. In addition, the transdentinal diffusion of CHX causes antibacterial activity against *S. mutans.*

Key words: Chlorhexidine; cytotoxicity; odontoblastos; Streptococcus mutans

INTRODUÇÃO







INTRODUÇÃO

A ocorrência de inflamação de etiologia bacteriana, principalmente na área da polpa relacionada com o assoalho cavitário (após remoção da cárie) ou no sítio de exposição da polpa, pode influenciar negativamente o processo de reparação tecidual. Estudos têm demonstrado que a contaminação bacteriana pode ser responsável pela ocorrência de recidiva de uma determinada patologia pulpar, bem como pela potencialização do efeito citotóxico de materiais odontológicos utilizados em variados procedimentos clínicos[7,41]. Desse modo, para que se tenha efetiva ação dos agentes forradores e capeadores, é necessária a obtenção de um ambiente asséptico do complexo dentino-pulpar, previamente à aplicação desses materiais sobre o tecido dentinário e/ou pulpar contaminado. Conseqüentemente, a utilização de agentes antibacterianos para lavagem de paredes cavitárias, após remoção de lesões de cárie, seria importante na manutenção das condições ideais para reparação do complexo dentino-pulpar.

Sabe-se que além de apresentar atividade antibacteriana, um agente de lavagem cavitária ideal deveria, também, não interferir na completa penetração do material resinoso na dentina desmineralizada, permitindo a adequada formação da camada híbrida quando da restauração adesiva de cavidades dentárias. Ainda, seria importante que esta substância pudesse, de alguma maneira, evitar a ocorrência de

degradação rápida da interface adesiva, o que faria com que a integridade da restauração fosse mantida por longo período de tempo[5,37].

Algumas pesquisas têm demonstrado que a clorexidina (CHX) na concentração de 2%, além de apresentar propriedade antibacteriana, não interfere na formação da camada híbrida[3] e inibe a ação das metaloproteinases (MMPs)[17]. Tem sido relatado que as MMPs presentes na dentina são importantes enzimas que participam efetivamente da contínua e acelerada degradação da interface resina/dentina após realização de restaurações adesivas[40]. Por outro lado, pesquisas recentes realizadas em dentes humanos determinaram que a aplicação de CHX, na concentração de 2%, sobre o substrato dentinário previamente condicionado com ácido, retarda, de maneira significante, a degradação da interface resina/dentina[2,23]. Entretanto, um agente químico ideal para lavagem cavitária com ou sem exposição pulpar não deveria causar efeitos tóxicos para as células da polpa, especialmente para os odontoblastos[38]. Isto porque estas células especializadas desempenham papel fundamental no processo de reparação do tecido pulpar e formação de barreira mineralizada. Por outro lado, uma injúria química aos odontoblastos primários poderia comprometer a capacidade de reparação do complexo dentino-pulpar[5] por indução de apoptose ou morte direta destas células por citotoxicidade[5,6]. Daí a necessidade de se utilizar sobre os substratos dentários, especialmente dentina e polpa, uma solução não tóxica para as células pulpares, de tal maneira que ela possa ser

empregada em diferentes situações clínicas, porém sem causar danos teciduais significantes.

Com o notável avanço da tecnologia envolvida no desenvolvimento de materiais resinosos que promovem adesão às estruturas dentárias, particularmente na interação entre sistemas adesivos resinosos e o substrato dentinário, diferentes procedimentos de tratamento das paredes cavitárias com agentes de limpeza têm sido propostos[5]. Uma substância amplamente utilizada em diversos procedimentos odontológicos e que pode vir a ser uma alternativa viável para a lavagem de cavidades dentárias com ou sem exposição da polpa subjacente é a CHX. Como é praticamente insolúvel em água, ela é preparada na forma de um sal, o digluconato de clorexidina, que lhe confere adequada solubilidade[12]. Seu potencial antimicrobiano tem sido amplamente demonstrado na literatura[4,10,11,16,24]. Sua efetividade é verificada contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo as bactérias Gram positivas e Gram negativas, esporos bacterianos, vírus lipofílicos, leveduras e dermatófitos, sendo que sua ação ótima ocorre na faixa de pH 5,5 a 7,0[22]. A CHX é uma molécula catiônica, capaz de adsorver-se à parede celular bacteriana, unindo-se a moléculas carregadas negativamente (proteínas e lipopolissacarídeos) e alterando a permeabilidade da membrana, o que promove o extravasamento de substâncias de baixo peso molecular. Em altas concentrações, o dano à membrana torna-se irreversível, pois há a penetração da CHX e a posterior precipitação de componentes

intracelulares microbianos[26]. Há quase quatro décadas Rolla et al.[32] (1970) mostraram que o digluconato de CHX adsorve-se também ao tecido dentário e à membrana mucosa, resultando na sua prolongada e gradual liberação, em níveis terapêuticos, à medida que sua concentração no meio decresce (substantividade). Essa propriedade da CHX faz com que este agente químico apresente efeito antimicrobiano prolongado, desde que sua liberação aconteça na forma biologicamente ativa no sítio de ação e em dose efetiva[19].

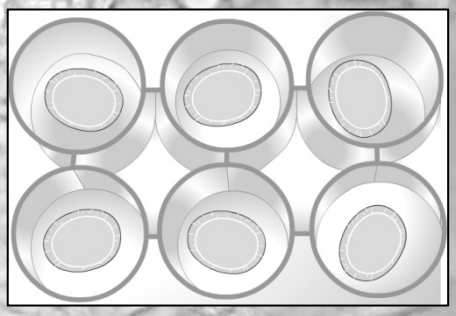
A susceptibilidade de agentes etiológicos da doença cárie à ação da CHX como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, foi demonstrada por D' Arcangelo et al.[8] (1999). Estes autores relataram que mesmo concentrações de CHX abaixo de 0,2% foram capazes de inativar todos os microrganismos testados, após 10 minutos de contato. Devido a complexidade anatômica dos canais radiculares, resíduos orgânicos e bactérias que não foram removidos pelo preparo mecânico realizados com instrumentos endodônticos, podem ser encontrados nos túbulos dentinários[15]. Assim, vários autores têm avaliado a atividade antimicrobiana da CHX como medicamento intracanal e como irrigante endodôntico[1,9,14,15,18,34]. Segundo Ferraz et al.[14] (2001) a CHX é capaz de desinfetar canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* in vitro. Todavia, assim como demonstrado para diferentes agentes químicos recomendados para limpeza de cavidades ou irrigação de canais radiculares[5,22,31,35], a CHX também apresenta efeitos citotóxicos

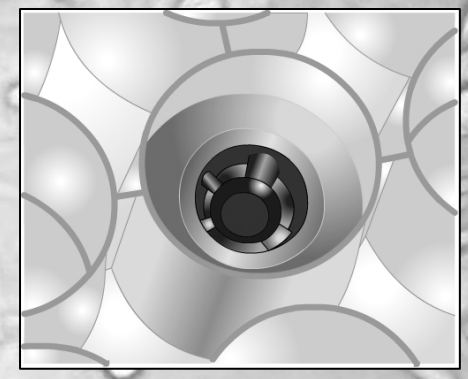
definidos sobre diferentes linhagens celulares. Estudos demonstraram que a CHX aplicada diretamente sobre células em cultura pode causar redução na síntese protéica e interferir na respiração mitocondrial das células, inibindo a síntese de DNA e a proliferação celular[13,25,30,37].

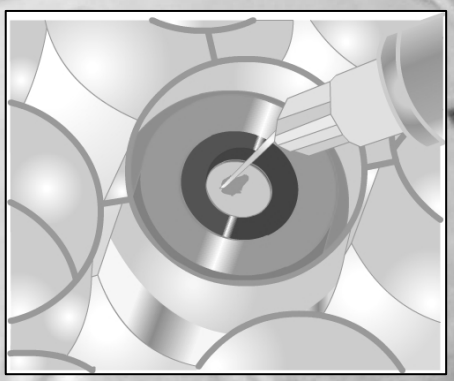
Nas últimas décadas, modelos in vitro que mimetizam o funcionamento de células pulpares in vivo foram desenvolvidos com o objetivo de investigar, em nível molecular, a resposta pulpar frente a diferentes estímulos[20,27-29,36]. A realização de pesquisas utilizando células odontoblastóides imortalizadas mantidas em cultura tem sido importante, uma vez que os odontoblastos são as primeiras células que entram em contato com substâncias que, por difusão transdentinária, alcançam a câmara pulpar[6]. Todavia, sabe-se que a dentina é uma importante barreira contra a difusão de substâncias em direção a polpa dental. Desta forma, a realização de pesquisas de citotoxicidade in vitro que incluam barreira dentinária e células imortalizadas de linhagem odontoblástica passaram a ser de grande interesse, pois permitem obter dados científicos inéditos de efeitos de componentes de soluções de limpeza ou de materiais dentários com capacidade de difusão transdentinária, sobre células específicas do tecido pulpar. Conseqüentemente, uma vez que são raros os dados científicos publicados na literatura que demonstram os efeitos citotóxicos transdentinário de diferentes concentrações de CHX quando aplicadas sobre barreiras de dentina de diferentes espessuras, o desenvolvimento de pesquisas nesta área específica da Odontologia é de

grande interesse para determinar a segurança de aplicação clínica dos procedimentos relacionados com a restauração de dentes cariados.

PROPOSIÇÃO







PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar o efeito citotóxico direto e transdentinário de diferentes concentrações de clorexidina, bem como sua atividade antibacteriana.

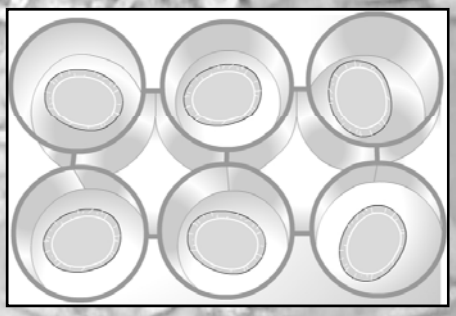
PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

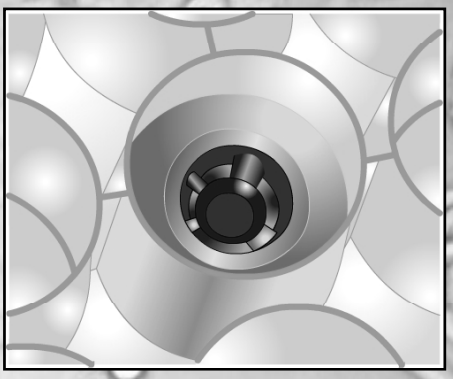
Artigo 1 - Avaliar a citotoxicidade de soluções aquosas de CHX em variadas concentrações aplicadas, por diferentes períodos, diretamente sobre a linhagem de células odontoblastóides MDPC-23 mantidas em cultura.

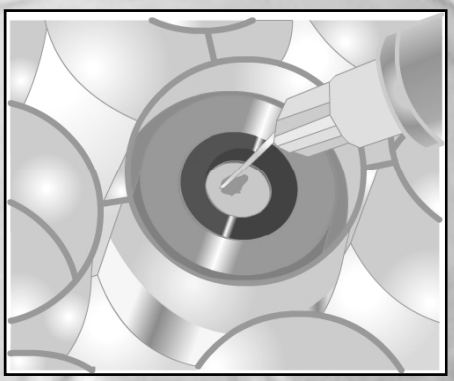
Artigo 2 - Avaliar a influência da espessura de dentina sobre o efeito citotóxico transdentinário de diferentes concentrações de clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23 mantidas em cultura.

Artigo 3 - Avaliar o potencial antibacteriano direto e transdentinário (teste indireto) de diferentes concentrações de clorexidina, sobre *S. mutans*.

Avaliação da toxicidade da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23







Artigo 1

Avaliação da toxicidade da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23

Fernanda Campos Rosetti Lessa[1], Andreza Maria Fabio Aranha[1], Indri Nogueira[1], Elisa Maria Aparecida Giro[1], Josimeri Hebling[1], Carlos Alberto de Souza Costa[2]

[1]Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara - SP, Brasil

[2]Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara - SP, Brasil

Autor correspondente:

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Departamento de Fisiologia e Patologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

R: Humaitá, 1680 – Centro. CEP: 14801-903, Araraquara - SP

Tel: + 55 (16) 3301 – 6477 / FAX: (16) 3301-6488 / E-mail: casouzac@foar.unesp.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos da clorexidina (CHX) aplicada sobre células da linhagem odontoblastóide MDPC-23. Para isto, 30.000células/cm^2 foram cultivadas em placas de acrílico de 24 compartimentos. Após 72 horas de cultivo, as células foram tratadas (n=22) com as seguintes concentrações de CHX: 0,06%; 0,12%; 0,2%; 1%; e 2%. Meio de cultura puro foi utilizado como controle negativo e a solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% como controle positivo. As soluções experimentais foram aplicadas sobre as células em diferentes períodos: 60 segundos, 2 horas e 60 segundos com recuperação de 24 horas. Para cada grupo, 10 espécimes foram usados para análise do metabolismo das células tratadas ou não com CHX (MTT assay), sendo que a dosagem de proteína total foi avaliada em outros 10 espécimes. Dois espécimes foram selecionados para avaliação da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura. A análise estatística monstrou que o efeito tóxico da CHX para as células odontoblastóides revelou ser dose dependente. Em relação ao período de aplicação das soluções, observou-se diferença estatística para todos os períodos e em todas as concentrações, sendo o período de 60 segundos o menos tóxico e o período de 60 segundos com 24 horas de recuperação o mais citotóxico. De acordo com as condições experimentais, foi possível concluir que as soluções experimentais em todos os períodos avaliados causam intenso efeito tóxico direto para as células MDPC-23 em cultura.

Introdução

Com o notável avanço no desenvolvimento de materiais resinosos e técnicas que promovem adesão com as estruturas dentárias, particularmente na interação entre sistemas adesivos resinosos e substrato dentinário, diferentes procedimentos de tratamento das paredes cavitárias com agentes de limpeza têm sido propostos [1]. Com relação aos procedimentos clínicos de restauração adesiva de cavidades dentárias, tem sido descrita a importância da utilização de substâncias com propriedades antimicrobianas para lavagem e assepsia das paredes cavitárias, previamente a aplicação dos sistemas adesivos. Todavia, além de apresentar atividade antimicrobiana, o agente de lavagem cavitária deveria também: 1) permitir a completa penetração do agente adesivo na dentina condicionada para formar adequada camada híbrida e 2) prevenir, ou pelo menos reduzir a degradação da interface adesiva, com manutenção da integridade da restauração por longo período de tempo [1-3].

Os odontoblastos são células especializadas que desempenham papel fundamental no processo de reparação do tecido pulpar e formação de barreira mineralizada [4]. Assim, uma injúria química aos odontoblastos primários poderia comprometer a capacidade de reparação do complexo dentino-pulpar por indução de apoptose ou morte direta destas células por citotoxicidade [1]. Portanto, além de todas as excelentes propriedades anteriormente descritas para um agente de limpeza de cavidades ideal,

este agente deveria também apresentar baixo, ou se possível nenhum efeito tóxico para as células da polpa, especialmente para os odontoblastos [5].

Uma substância amplamente utilizada em diversos procedimentos odontológicos e que pode ser uma alternativa viável para a lavagem de cavidades dentárias com ou sem exposição da polpa é a clorexidina (CHX). O potencial antimicrobiano da CHX foi comprovado sobre um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias Gram positivas e negativas, esporos bacterianos, vírus lipofílicos, leveduras e dermatófitos [6-10]. A ação ótima da solução de CHX ocorre dentro de valores específicos de pH, o qual varia de 5,5 até 7,0 [12]. Assim como demonstrado para diferentes agentes químicos recomendados para limpeza de cavidades ou irrigação de canais radiculares [1,11-13], a CHX também apresenta efeitos citotóxicos definidos sobre diferentes linhagens celulares [14-16]. Experimentos in vitro têm sido realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos de ação da CHX, demonstrando seu potencial citotóxico pela inibição de síntese protéica [14,15], indução de apoptose em baixas concentrações e de necrose quando utilizada em altas concentrações [16], além de inibição da síntese de DNA [17]. O potencial tóxico da CHX também pode estar relacionado ao tempo de exposição [18] e à concentração aplicada sobre as células [19]. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a CHX poderia ser utilizada como agente de lavagem de cavidades após remoção de cárie, pois além de atividade

antimicrobiana, este agente químico não interfere na formação da camada híbrida [20] e inibe a ação das metaloproteinases [21], retardando a degradação da interface resina/dentina [22].

Nas últimas décadas, modelos in vitro que mimetizam o funcionamento de células pulpares in vivo foram desenvolvidos a fim de se investigar, em nível molecular, a resposta pulpar frente a diferentes estímulos [23-27]. A realização de pesquisas utilizando células odontoblastóides imortalizadas mantidas em cultura tornou se importante, uma vez que os odontoblastos são as primeiras células a entrarem em contato com substâncias, que por difusão transdentinária, alcançam a câmara pulpar [28]. Assim, diante das recomendações de uso clínico da CHX, seria interessante determinar o potencial citotóxico de diferentes concentrações de CHX disponíveis comercialmente, sobre células pulpares. Desta forma, objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade de soluções aquosas de CHX em várias concentrações aplicadas por diferentes períodos diretamente sobre a linhagem de células odontoblastóides MDPC-23 em cultura.

Material e Método

Cultivo das células MDPC-23

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas de acrílico de 75cm^2 (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura α-MEM (Minimum essential medium eagle

alpha modification, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100IU/mL e 100μg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 e 95% de ar, na temperatura de 37°C. Estas células foram subcultivadas a cada três dias na concentração de 30.000células/cm^2, até se obter o número de células suficiente para a execução do experimento.

Avaliação do metabolismo celular

A atividade metabólica celular foi avaliada utilizando-se o teste colorimétrico do metiltetrazolium (MTT assay), por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células [29].

Uma solução de CHX 20% (Farmácia Escola, UNESP, Araraquara, SP, Brasil) foi diluída em meio de cultura α-MEM sem soro fetal bovino (puro), de modo a obter as diferentes concentrações experimentais de 0,06%, 0,12%, 0,2%, 1% e 2%. O meio de cultura α-MEM puro foi utilizado como controle negativo e a solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração de 3%, foi empregada como controle positivo. As soluções de CHX foram aplicadas sobre as células em diferentes períodos: 60 segundos, 2 horas e 60 segundos com recuperação de 24 horas. Dez amostras por grupo experimental

foram utilizadas para avaliar a atividade metabólica das células e outras 2 amostras foram processadas para análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As células MDPC-23 (30.000células/cm^2) foram cultivadas em placas de acrílico esterilizadas com 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) e incubadas por 72 horas em atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 e na temperatura de 37^oC. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e as diferentes soluções de CHX, bem como as soluções controle foram introduzidas em cada compartimento, sendo então mantidas em contato com as células pelos períodos pré-determinados.

Após os diferentes períodos de exposição das células às concentrações de CHX e às soluções controle, estas foram aspiradas e substituídas em cada compartimento por 900µL de meio de cultura α-MEM e 100µL de solução de MTT (5mg de MTT/mL de solução salina fosfatada tamponada – PBS). Após 4 horas de incubação das células em contato com a solução de MTT, esta foi aspirada, sendo então, aplicada uma solução de 600µL de isopropanol acidificado em ácido clorídrico (HCl) a 0,04N. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570nm em leitor de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader- BIOTEK Instruments, ICC, USA).

Em seguida, três alíquotas de 100µL de cada compartimento foram colocadas em um novo recipiente acrílico de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Para a padronização da leitura,

os dois compartimentos iniciais dos recipientes foram preenchidos com 100μL da solução de isopropanol acidificado, para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz, ou seja, ao valor máximo correspondente a redução do metabolismo celular. Os resultados foram determinados através da média dos valores numéricos obtidos das três alíquotas selecionadas.

Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura

Dois espécimes representativos de cada grupo foram submetidos à análise de morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isto, antes de cultivar as células MDPC-23 nos compartimentos de acrílico (30.000células/cm^2), lamínulas de vidro com 12mm de diâmetro esterilizadas (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) foram posicionadas na base destes compartimentos. Assim, após os diferentes períodos de contato das células com as soluções experimentais e controle, estas foram aspiradas, sendo que as células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro foram imersas por 120 minutos em 1mL de glutaraldeído tamponado a 2,5%. Posteriormente, estas células foram submetidas a lavagem por três vezes com 1mL de PBS (5 minutos cada lavagem), pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos, sendo então processadas para avaliação em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, model DSM-940A, Oberkochen,

Germany). A análise da morfologia celular foi realizada de forma descritiva.

Dosagem de proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada em 10 espécimes de cada grupo experimental e controle. O meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com 2mL de PBS aquecido a 37ºC. Realizou-se a lise das células adicionando 2mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em cada well por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então homogeneizadas e 1mL de cada placa foi transferido para tubos Falcon (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) (testes) devidamente identificados, sendo que para o tubo branco, acrescentou-se 1mL de água destilada. Em seguida, 1mL de Solução de Reagente de Lowry (Sigma) foi adicionado em todos os tubos, sendo agitados por 10 segundos em agitador de tubos (Phoenix AP 56, Araraquara, SP, Brasil) e permanecendo por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, acrescentou-se em cada tubo, 500µL de Solução de Folin e Ciocalteau´s Phenol Reagent (Sigma), novamente agitados por 10 segundos em agitador de tubos. Trinta minutos após, três alíquotas de 100µL de cada tubo foram transferidas para uma placa de 96 wells e a absorbância dos tubos testes e branco foi lida no comprimento de onda de 620nm em leitor de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader- BIOTEK Instruments, ICC, USA). Os valores de absorbância obtidos de cada tubo foram

transformados em concentração de proteína total (µg/mL) através de uma curva padrão.

Tratamento estatístico dos resultados

Como a análise do metabolismo celular e da dosagem de proteína total forneceu dados contínuos em distribuição não-normal, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a análise da variável, período e grupo. Os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Metabolismo celular (MTT)

Os resultados de metabolismo celular, após os diferentes períodos de contato das soluções experimentais e controle com as células MDPC-23, estão apresentados na Tabela 1.

A análise estatística demonstrou existir diferença quanto ao metabolismo celular entre as soluções experimentais e controle, assim como entre os períodos de aplicação das mesmas ($p<0,05$). Comparando-se somente os grupos, de uma forma geral, observou-se que todas as concentrações de CHX causaram intenso efeito tóxico para as células MDPC-23. As soluções aquosas de 0,06% e 0,12% de CHX causaram os menores efeitos tóxicos para as células, não sendo

determinada diferença estatística entre elas (p>0,05). Os efeitos citotóxicos para células odontoblastóides foram maiores à medida que a concentração da CHX aumentou, caracterizando o efeito tóxico dose dependente para este agente químico. O grupo controle positivo, onde a concentração de 3% de H_2O_2 foi aplicada sobre as células, causou o efeito tóxico mais intenso para as células cultivadas. De maneira geral, a redução percentual do metabolismo celular para as concentrações de 0,06%; 0,12%; 0,2%; 1,0% e 2,0% de CHX foi de 61%, 63%, 65%, 67% e 70%, respectivamente.

Em relação ao período de aplicação das soluções experimentais, observou-se diferença estatística para todos os períodos, em todas as concentrações, sendo o período de 60 segundos menos tóxico e o período de 60 segundos e 24 horas de recuperação o mais citotóxico. As taxas do metabolismo celular em função da variável grupo e de acordo com o período de aplicação das soluções experimentais estão representadas graficamente na Figura 1.

Morfologia celular (MEV)

Dois espécimes representativos de cada grupo experimental e controle foram selecionados para avaliação da morfologia das células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro. Assim, foi possível demonstrar que no grupo controle negativo, para todos os

períodos avaliados, as células MDPC-23 apresentavam-se próximas da confluência e organizadas em nódulos epitelióides (Figura 2a/b).

Para os grupos experimentais, foi observado em todos os períodos, maior alteração da morfologia celular e menor número de células aderidas ao substrato de vidro (figura 3a/b). Isto foi mais significante na medida em que a concentração de CHX aumentava e seu tempo de aplicação sobre as células em cultura se prolongava. Um maior número de células permaneceu aderido ao substrato quando a solução de CHX foi aplicada sobre as células pelo período de 60 segundos (figura 3a/b). Desta maneira, para as concentrações mais baixas de CHX e menor tempo de aplicação, células com morfologia semelhante ao grupo controle negativo foram observadas, porém em menor quantidade. Por outro lado, o número de células MDPC-23 que permaneceu aderido ao substrato de vidro reduziu de maneira crescente na medida em que a concentração das soluções de CHX aumentava. Estas células apresentavam tamanho reduzido e morfologia arredondada (figura 4a/b). Extensas áreas com ausência de células e um grande número de debris de membrana celular foram observados.

No grupo controle positivo (3% H_2O_2), o reduzido número de células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro exibiam forma arredondada e com perda total ou manutenção de poucos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 5a). Estas características morfológicas das poucas células aderidas ao substrato também foram

observadas para todos os grupos onde a solução de 2% de CHX foi aplicada sobre as células MDPC-23 (figura 5b).

Dosagem de proteína total

Os resultados da dosagem da proteína total, após os diferentes períodos de contato das soluções experimentais e controle com as células MDPC-23, estão apresentados na Tabela 2.

Houve diferença estatística entre as soluções experimentais e os controles, assim como entre os períodos de aplicação das mesmas ($p<0,05$). As células tratadas com as soluções experimentais por apenas 60 segundos apresentaram maior dosagem de proteína total, seguido do grupo de 2h e de 60 segundos com recuperação de 24h. Com relação às concentrações de CHX avaliadas, a diminuição da dosagem de proteína ocorreu de uma forma dose dependente.

A representação gráfica da dosagem de proteína total em função da variável grupo e período de aplicação das soluções experimentais está representada graficamente na Figura 6.

Discussão

Devido ao seu reconhecido efeito antimicrobiano e outras interessantes propriedades, a CHX tem sido alvo de intensas pesquisas em diferentes áreas da saúde, especialmente na Odontologia. Apesar da

CHX apresentar várias propriedades positivas, dentre elas a não interferência na adesão do agente de união com o substrato dentinário [20] e a inibição das metaloproteinases presentes na dentina [30], estudos in vitro têm demonstrado seu efeito tóxico sobre células eucariontes, associado a redução de síntese protéica [15]. A CHX pode também interferir na respiração mitocondrial das células [31], inibindo a síntese de DNA e a proliferação celular [17]. Todavia, os mecanismos específicos de ação da CHX sobre células ainda não foram completamente esclarecidos. Na presente pesquisa, experimentos in vitro foram realizados para obter maiores informações sobre a toxicidade induzida por diferentes concentrações de CHX e compreender se os efeitos citopáticos deste agente químico estão relacionados com o tempo de contato com células de linhagem odontoblástica. Foi demonstrado que a aplicação de todas as concentrações de CHX sobre as células MDPC-23 causou maior efeito citotóxico no período de 2 horas de contato quando comparado com o tempo de 60 segundos. Este dado científico demonstra que o efeito citotóxico da CHX, independente de sua concentração, se torna mais intenso quanto mais prolongado é o tempo em que as células odontoblastóides são expostas ao agente químico em estudo. Porém, os efeitos tóxicos mais intensos da CHX ocorreram quando as células tratadas por 60 segundos com as variadas concentrações de CHX permaneceram por um tempo adicional de 24 horas em incubadora. Estes dados sugerem que mesmo após remover a solução de CHX do contato

direto com as células em cultura, este agente químico mantém-se, com o decorrer do tempo, interagindo com as estruturas celulares, lesando-as diretamente ou inibindo seu metabolismo. Este efeito contínuo das soluções de CHX sobre as células certamente foi causado pela sua comprovada substantividade [32,33]. A falta de recuperação das células em cultura após contato com CHX também foi demonstrado por Pucher e Daniel [15]. Os pesquisadores aplicaram uma solução de 0,12% de CHX por 30 segundos sobre fibroblastos humanos e mantiveram as células em incubadora pelo período de recuperação de 7 dias. Foi demonstrado, através da análise da proliferação e viabilidade celular, que as células não se recuperaram dentro do período estabelecido. Estes dados científicos foram corroborados também por Mariotti e Rumpf [34]. Os autores demonstraram que a CHX, na concentração de 0,12%, aplicada sobre fibroblastos humanos pelos tempos de 1, 5 e 15 minutos com período de recuperação de 24 horas, provocou redução de 72,7% na proliferação celular, a qual não variou de acordo com os tempos de aplicação estabelecidos. A redução no metabolismo celular observada nesta pesquisa, especialmente para as concentrações mais elevadas de CHX, pode ter sido resultado da inibição da atividade mitocondrial das células ou por intensa morte celular direta, como observado na análise microscópica da morfologia e número de células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro. Assim, pode-se especular que a CHX não seria um agente ideal para limpeza e assepsia do tecido pulpar exposto,

visto que mesmo após sua lavagem da cavidade, este agente químico poderia manter sua atividade tóxica sobre as células pulpares subjacentes devido sua substantividade. Quanto à utilização da CHX para lavagem de cavidades, futuras pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de avaliar a capacidade de difusão deste agente químico através de barreiras dentinárias com diferentes espessuras, bem como a relação entre a concentração de CHX aplicada sobre a dentina e àquela que alcança o espaço pulpar.

Há algumas décadas, uma ampla variedade de linhagens celulares tem sido utilizada para avaliar a citotoxicidade da CHX. Hidalgo e Dominguez [17] demonstraram que concentrações de CHX superiores a 0,005%, quando aplicadas por 3 horas sobre fibroblastos dérmicos, são capazes de causar a morte destas células. Ao analisar semelhantes concentrações de CHX dentro do mesmo período de contato, porém utilizando diferente técnica de avaliação celular, Goldschmidt et al. [14] observaram que não havia morte celular. Todavia, pesquisa recente demonstrou que uma concentração de CHX tão baixa quanto 0,016% aplicada por 24 horas sobre fibroblastos L929, foi capaz de aumentar em 79,77% a taxa de necrose desta células [16]. Chang et al. [31] verificaram que o contato da solução de CHX 0,125% por 120 segundos com fibroblastos humanos do ligamento periodontal causaram quase a total inibição da atividade mitocondrial destas células. As variações metodológicas empregadas nas diferentes pesquisas que avaliaram os

efeitos das soluções de CHX sobre cultura de células podem explicar a diversidade de resultados encontrados na literatura. No presente estudo, decidiu-se avaliar o efeito tóxico da CHX sobre células odontoblastóides MDPC-23 devido ao fato de que nos dentes de mamíferos, os odontoblastos se organizarem em monocamada para revestir internamente a dentina coronária e radicular [4]. Assim, qualquer produto odontológico ou componentes destes que apresente capacidade de se difundir através dos túbulos dentinários, irá interagir, de maneira inicial, com estas células pulpares periféricas, as quais são importantes para o processo de reparação deste tecido especializado [35]. Desde que a concentração de 2% de CHX tem sido recomendada para aplicação sobre dentina após remoção da lesão de cárie [22,36], tornou-se importante demonstrar, através desta pesquisa inicial, qual concentração de CHX seria responsável por possíveis danos para as células pulpares. Sabe-se que a dentina atua como uma verdadeira barreira biológica, conferindo proteção às células pulpares [37]. Assim, é de se esperar que uma reduzida concentração de CHX poderá alcançar o espaço pulpar de um dente após aplicação de uma solução, tal como àquela com 2% de CHX, sobre o assoalho cavitário em dentina. Baseado nestes fatos, concentrações de CHX que variavam de 0,06% até 2% foram selecionadas para serem avaliadas na presente pesquisa. Desta forma, foi demonstrado que todas as concentrações de CHX testadas causaram efeitos tóxicos para as células MDPC-23 de uma forma dose dependente, sendo que a porcentagem de inibição do metabolismo celular para as

concentrações entre 0,06% e 2% de CHX variou entre 42% e 78%, respectivamente. Deve-se ressaltar que na presente pesquisa não houve adição de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura durante a diluição da CHX para obtenção das concentrações finais utilizadas no experimento. Isto ocorreu porque Mariotti e Rumpf [34] demonstraram que a adição de soro fetal bovino nas concentrações de 0,1 a 10% em meio de cultura causa precipitação imediata da CHX. Este dado foi confirmado por Hidalgo e Dominguez [17], os quais verificaram que a presença do SFB a 10% no meio de cultura proporcionou um efeito atenuante na citotoxicidade da CHX, permitindo maior sobrevivência das células e elevados níveis de ATP intracelular e síntese de DNA. Isso pode ter ocorrido devido a ligações não específicas da CHX com as proteínas do soro, levando a uma menor disponibilidade do fármaco para agir sobre as células em cultura.

Segundo alguns autores, uma das formas de ação da CHX sobre células em cultura é através da inibição da síntese protéica. Pucher e Daniel [15] demonstraram que a CHX a 0,12% aplicada por 30 segundos sobre células em cultura, reduz em torno de 50% a síntese de proteína total, enquanto Mariotti e Rumpf [34] ao aplicarem a mesma concentração de CHX por 1 minuto com tempo de recuperação de 24 horas, revelaram redução de 98,8% e 98,2% nas proteínas colágenas e não colágenas, respectivamente. Goldschmidt et al. [14] também mostraram 97% de inibição protéica provocada pela solução de 0,2% de CHX aplicada por 3 horas sobre cultura de fibroblastos. Na presente pesquisa foi demonstrado

que a redução da proteína total variou de 12% a 56% de acordo com a concentração de CHX aplicada sobre as células MDPC-23. Assim, a atividade de inibição de síntese protéica pelas soluções de CHX também é dose dependente. Apesar de Mariotti e Rumpf [34] constatarem que a redução da proteína total pode ocorrer mesmo não havendo redução na proliferação celular, os dados da presente pesquisa demonstraram que a queda na síntese protéica pelas células odontoblastóides tratadas com CHX acompanhou a redução do metabolismo celular.

Com relação à morfologia celular, foram observadas maiores alterações das células de acordo com o aumento da concentração de CHX nas soluções. Estas alterações morfológicas das células MDPC-23 também foram mais intensas na medida em que elas eram mantidas por maior tempo em contato com as soluções experimentais de CHX. Nestes casos, as células apresentavam tamanho reduzido e morfologia arredondada. Extensas áreas livres de células ou com presença de apenas restos de membrana celular rompida foram observadas. Essas observações, as quais determinaram a direta correlação entre a concentração das soluções de CHX e seus efeitos citotóxicos para as células MDPC-23, foram corroborados por Souza et al. [19], apesar dos autores terem utilizado concentrações inferiores de CHX em seu experimento.

De maneira geral, foi demonstrado na presente pesquisa, os definidos efeitos citopáticos de diferentes concentrações de soluções

aquosas de CHX aplicadas por variados tempos sobre células odontoblastóides em cultura. Todavia, deve-se ressaltar que os resultados obtidos por testes de citotoxicidade in vitro apresentam limitações quanto a sua correlação direta com situações clínicas, especialmente quando uma barreira dentinária é interposta entre o agente químico a ser testado e as células pulpares. Desta forma, futuras pesquisas deverão ser realizadas com o objetivo de avaliar a possível difusão transdentinária de soluções de CHX aplicadas sobre discos de dentina de variadas espessuras e os efeitos dos extratos (diffusates) sobre células de linhagem odontoblástica. Estes estudos certamente fornecerão maior segurança de aplicação clínica de soluções de CHX.

Conclusão

Baseado nos resultados obtidos na presente pesquisa, foi possível concluir que soluções aquosas de CHX aplicadas por diferentes períodos sobre células odontoblastóides MDPC-23 são tóxicas de maneira dose e tempo dependentes. Assim, quanto maior a concentração da solução de CHX e seu tempo de aplicação sobre as células, maiores são seus efeitos citotóxicos. De acordo com a metodologia empregada na presente pesquisa, também foi possível determinar que células MDPC-23 não são capazes de se recuperar do efeito citopático imediato causado pela CHX nas concentrações avaliadas.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grants: 476137/2006-3 e 301029/2007-5) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Os autores agradecem também a contribuição do Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, da Universidade de São Paulo (USP), coordenado pelo Prof. Dr. Elliot W. Kitajima.

REFERÊNCIAS

1. C. A. S. COSTA, C. A. EDWARDS, C. T. HANKS. *Am J Dent*. **14** (2001) 25.
2. J. C. MEIERS, J. C. KRESIN. *Oper Dent.* **21** (1996) 153.
3. S. GÜRGAN, S. BOLAY, A. KIREMITÇI. *J Oral Rehabil.* **26** (1999) 836.
4. V. E. ARANA-CHAVEZ, L. F. MASSA. *Int J Biochem Cell Biol.* **36** (2004) 1367.
5. P. P. SOUZA, A. M. ARANHA, J. HEBLING, E. M. GIRO, C. A. S. COSTA. *Dent Mater.* **22** (2006) 838.
6. A DAVIES. *J Periodontol.* **12** (1973) 68.
7. T. S. HENNESSEY. *J Periodontol Res.* **8** (1973) 61.

8. C. G. EMILSON. *Scand J Dent Res.* 85 (1977) 255.
9. F. CERVONE, L. TRONSTAD, B. HAMMOND. *Endod Dent Traumatol.* **6** (1990) 33.
10. C. F. FRANCO, A. L. PATARO, L. C. R SOUZA, V. R. SANTOS, M. E. CORTÉS, R. D. SINISTERRA. *Artif Organs.* **27** (2003) 486.
11. C. H. J. HAUMAN, R. M. LOVE. *Int Endod J.* **36** (2003) 75.
12. A. SERPER, S. CALT, A. L. DOGAN, D. GUC, B. OZIELIK, T. KURANER. *J Oral Sci.* **43** (2001) 233.
13. Ö. ÖNÇAĞ, M. HOŞGÖR, S. HILMIOĞLU, O. ZEKIOĞLU, C. ERONAT, D. BURHANOĞLU. *Int Endod J.* **36** (2003) 423.
14. T. P. GOLDSCHMIDT, R. COGEN, S. TAUBMAN. *J Periodontol.* **48** (1977) 212.
15. J. J. PUCHER, J. C. DANIEL. *J Periodontol.* **63** (1992) 526.
16. G. FARIA, M. R. CELES, A. DE ROSSI, L. A. SILVA, J. S. SILVA, M. A. ROSSI. *J Endod.* **33** (2007) 715.
17. E. HIDALGO, C. DOMINGUEZ. *Toxicol In Vitro.* **15** (2001) 271.
18. H. BABICH, B. J. WURZBURGER, Y. L. RUBIN, M. C. SINENSKI, L. BLAU. *Cell Biol Toxicol.* **11** (1995) 79.
19. L. B. SOUZA, S. G. AQUINO, P. P. C. SOUZA, J. HEBLING, C. A. S. COSTA. *Am J Dent.* **20** (2007) 400.
20. F. L. DE CASTRO, M. F. ANDRADE, S. L. DUARTE-JÚNIOR, L. G. VAZ, F. J. AHID. *J Adh Dent.* **5** (2003) 129.
21. R. GENDRON, D. GRENIER, T. SORSA, D. MAYRAND. *Clin*

Diagnost Lab Immunol. **6** (1999) 437.

22. J. HEBLING, D. H. PASHLEY, L. TJÄDERHANE, F. R. TAY. *J Dent Res.* **84** (2005) 741.
23. A. SHTEYER, D. GAZIT, I. BINDERMAN, I. A. BAB. *In Vitro Cell Dev Biol.* **23** (1987) 15.
24. S. KASUGAI, M. ADACHI, H. HOGURA. *Arch Oral Biol.* **33** (1988) 887.
25. T. KAWASE, S. SATO, K. MIAKE, S. SAITO. *Adv Dent Res.* **2** (1988) 234.
26. M. MACDOUGALL, F. THIEMANN, H. TA, P. HSU, L. S. CHEN, M. L. SNEAD. *Connect Tissue Res.* **33** (1995) 97.
27. C. T. HANKS, Z. L. SUN, D. N. FANG, C. A. EDWARDS, J. C.WATAHA, H. H. RITCHIE, W. W. BUTLER. *Connect Tissue Res.* **37** (1998) 233.
28. C. A. S. COSTA, M. A. VAERTEN, C. A. EDWARDS, C. T. HANKS. *Dent Mat.* **15** (1999) 434.
29. T. MOSMANN. *J Immunol Methods.* **65** (1983) 55.
30. L. TJÄDERHANE, H. LARJAVA, T. SORSA, V. J. UITTO, M. LARMAS, T. SALO. *J Dent Res.* **77** (1998) 1622.
31. Y. C. CHANG, F. M. HUANG, K. W. TAI, M. Y. CHOU. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **92** (2001) 446.
32. G. RÖLLA, B. MELSEN. *J Dent Res.* **54** (1975) B57.
33. O. FARDAL, R. S. TURNBULL. *J Am Dent Assoc.* **112** (1986) 863.

34. A. J. MARIOTTI, D. A. RUMPF. *J Periodontol.* **70** (1999) 1443.
35. C. T. HANKS, J. C. WATAHA, R. R. PARSELL, S. E. STRAWN, J. C. FAT. *J Oral Rehabil.* **21** (1994) 475.
36. M. R. CARRILHO, S. GERALDELI, F. TAY, M. F. DE GOES, R. M. CARVALHO, L. TJÄDERHANE, A. F. REIS, J. HEBLING, A. MAZZONI, L. BRESCHI, D. PASHLEY. *J Dent Res.* **86** (2007) 529.
37. K. GALLER, K. A. HILLER, T. ETTL, G. SCHMALZ. *J Endod.* **31** (2005) 396.

Tabela 1. Medianas (P25-P75) dos valores de absorbância correspondente ao metabolismo celular obtidos no teste de MTT segundo os grupos e períodos experimentais.

Grupos*	**Períodos**		
	2 h	**60 s**	**60 s +24 h rec**
0,06 % CHX	0,1947 (0,1863-0,2103) A,a	0,2679 (0,2370-0,2815) AB,b	0,1200 (0,1166-0,1300) A,c
0,12% CHX	0,1679 (0,1601- 0,1736) B,a	0,2591 (0,2457-0,2676) A,b	0,1239 (0,1140-0,1294) A,c
0,2% CHX	0,1535 (0,1472-0,1544) C,a	0,2359 (0,2009-0,2964) ABC,b	0,1174 (0,1121-0,1275) AB,c
1% CHX	0,1408 (0,1373-0,1442) D,a	0,2437 (0,2277-0,2552) B,b	0,1184 (0,1094-0,1247) AC,c
2% CHX	0,1264 (0,1226-0,1381) E,a	0,2123 (0,1941-0,2211)C,b	0,1131 (0,1062-0,1177) BC,c
α-MEM	0,5661 (0,5438-0,5961) F,a	0,4616 (0,3811-0,4691) D,b	0,4902 (0,4732-0,5357) D,c
H_2O_2	0,0700 (0,0666-0,0725) G,a	0,1211 (0,1121-0,1327) E,b	0,1291 (0,1176-0,1363) A,b

* n=10 para cada período dentro do mesmo grupo

A Grupos seguidos de letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas iguais nas linhas representam medianas que não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05)

Tabela 2. Medianas (P25-P75) dos valores de absorbância correspondente a dosagem de proteína total segundo os grupos e períodos experimentais (µg/mL).

Grupos*	**Períodos**		
	2 h	**60 s**	**60 s +24 h rec**
0,06 % CHX	111,62 (101,61-120,02) A, a	120,83 (114,87-127,33) A, b	95,92 (92,94-100,52) A, c
0,12% CHX	98,09 (95,37-110,27) AB, a	115,96 (110,81-121,37) AB, b	94,83 (87,52-96,73) A, c
0,2% CHX	97,55 (93,21-101,34) B, a	112,71 (107,02-118,39) BC, b	88,88 (84,82-92,12) B, c
1% CHX	88,34 (83,73-90,23) C, a	107,84 (105,12-111,89) C, b	76,96 (72,36-80,21) C, c
2% CHX	81,84 (80,21-85,90) C, a	102,96 (100,79-104,85) D, b	70,46 (67,21-72,36) D, c
α-MEM	179,87 (163,07-220,49) D, a	138,16 (136,54-148,99) E, b	159,83 (157,39-164,97) E, c
H_2O_2	71,55 (68,30-76,15) E, a	76,96 (71,55-81,29) F, b	70,46 (69,11-73,17) D, a

* n=10 para cada período dentro do mesmo grupo

A Grupos seguidos de letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05)

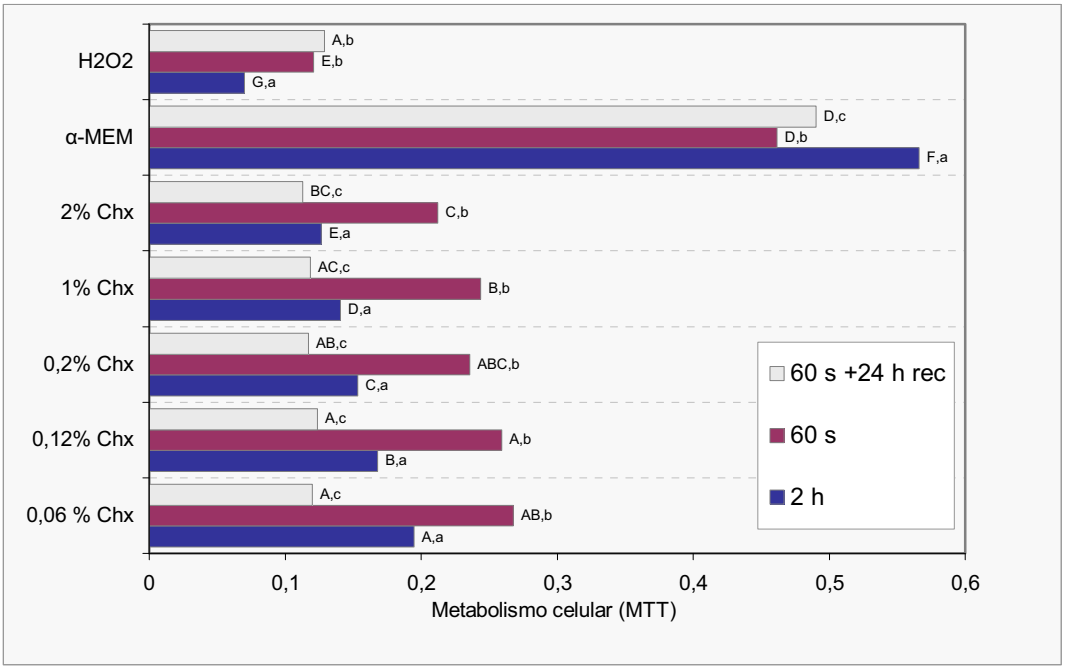


Figura 1. Representação gráfica dos valores de metabolismo celular (MTT) segundo a interação das variáveis GRUPO e PERÍODO. Barras representam medianas (n=10) sendo que as designadas com letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (Mann-Whitney, p>0,05).

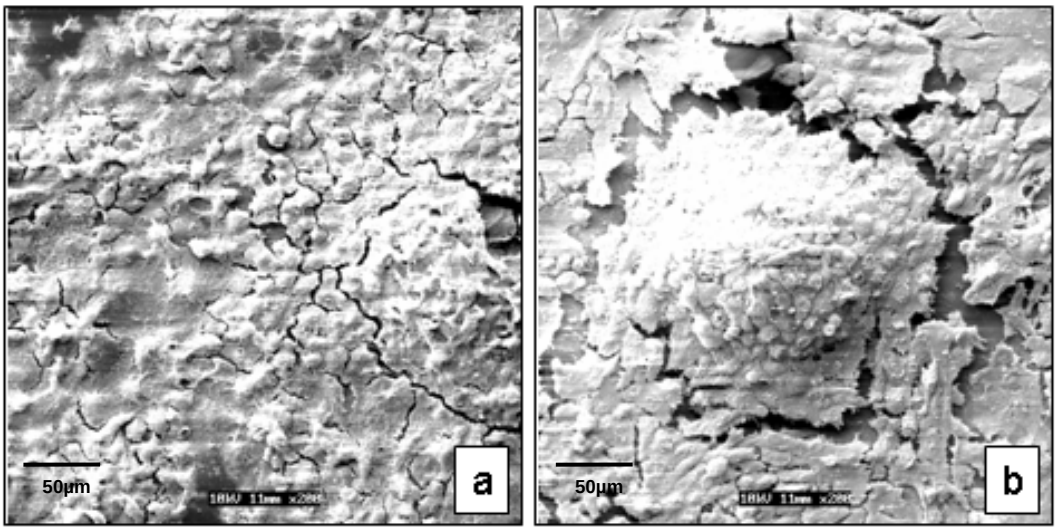


Figura 2a/b. Controle negativo α-MEM, MEV 200x: Células MDPC-23 aderidas ao substrato, as quais estão próximas da confluência, com formação de nódulos epitelióides.

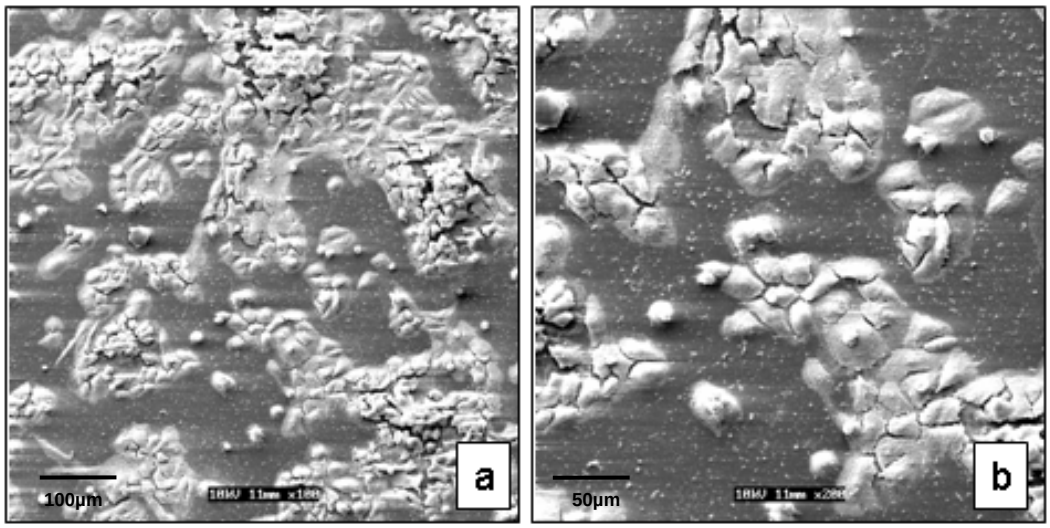


Figura 3a. CHX 0,06% - 60s. MEV 100x. Células com características semelhantes ao grupo controle negativo podem ser observadas, com formação de nódulos epitelióides. **3b.** Detalhe da figura anterior em maior aumento. MEV 200x. Note alteração da morfologia celular e menor número de células aderidas ao substrato de vidro.

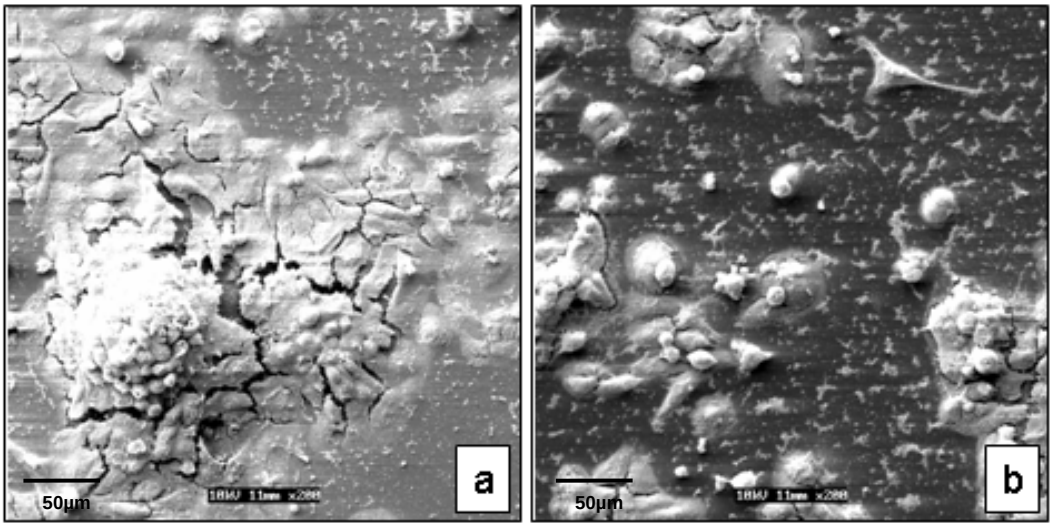


Figura 4a. CHX 0,06% - 60s com recuperação de 24h. MEV 200x. Células com morfologia alterada e presença de poucos nódulos epitelióides, cercado de restos celulares. **4b.** CHX 1% - 60s com recuperação de 24h. MEV 200x. Note menor número de células remanescentes e restos de prolongamentos citoplasmáticos que se destacaram do substrato.

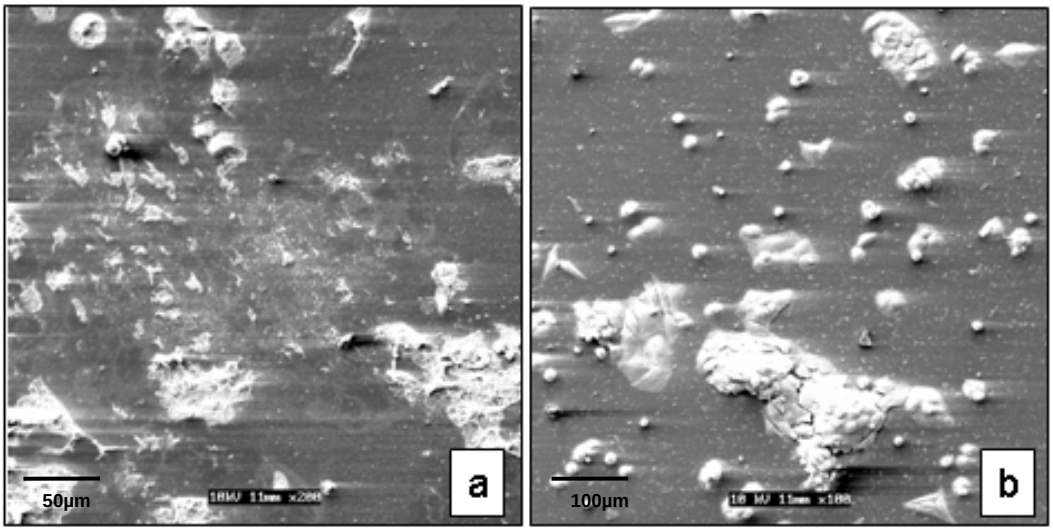


Figura 5a. H_2O_2 3% - 2h. MEV 200x. Algumas das células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro exibiam forma arredondada e com perda total ou manutenção de poucos prolongamentos citoplasmáticos. **5b.** CHX 2% - 2h. MEV 100x. Estas características morfológicas das poucas células aderidas ao substrato também foram observadas para todos os grupos onde a solução de 2% de CHX foi aplicada sobre as células MDPC-23.

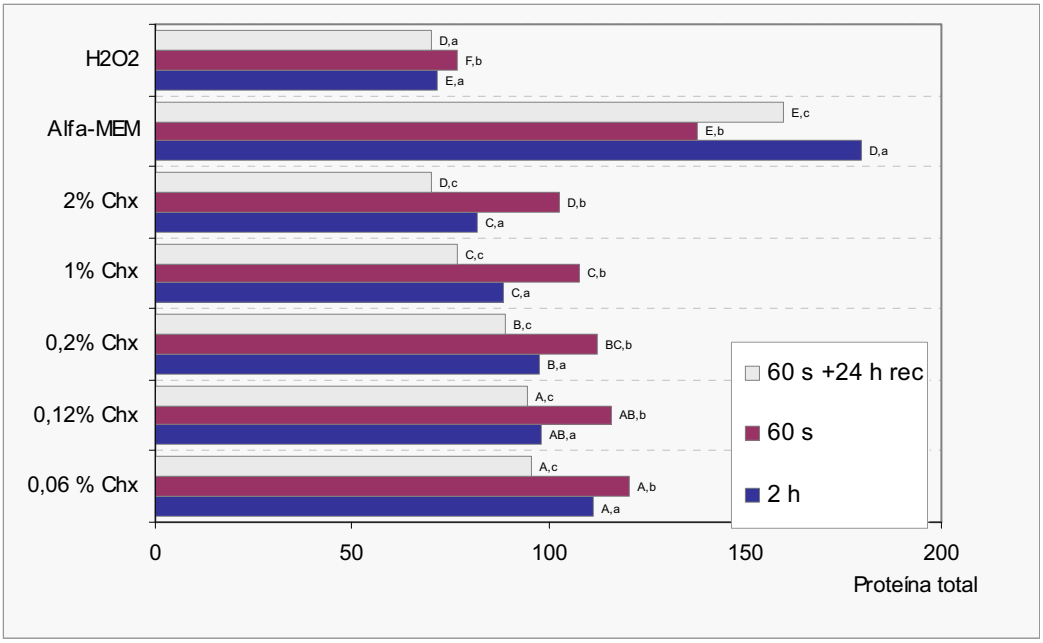
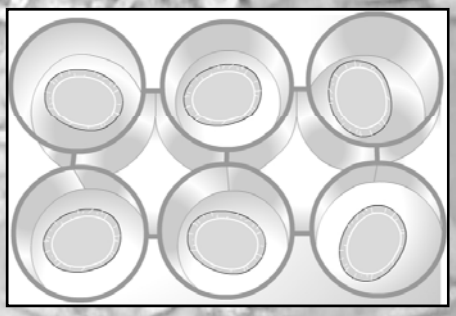
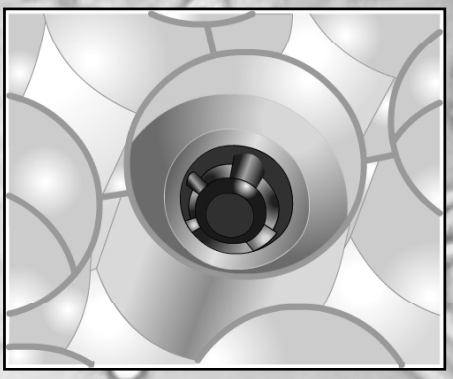
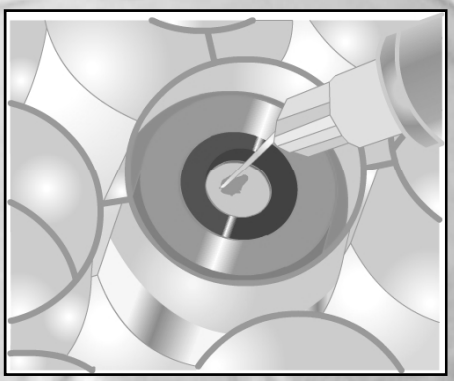


Figura 6: Representação gráfica dos valores de proteína total segundo as variáveis GRUPO e PERÍODO. Barras representam medianas (n=10) sendo que as designadas com letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos em cada período e as designadas com letras minúsculas iguais indicam ausência de diferença estatística entre os períodos para o mesmo grupo (Mann-Whitney, p>0,05).

Toxicidade transdentinária da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23







Artigo 2

Toxicidade transdentinária da clorexidina sobre células odontoblastóides MDPC-23

Fernanda Campos Rosetti Lessa[1], Indri Nogueira[1], Cláudia Huck[1], Josimeri Hebling[1], Carlos Alberto de Souza Costa[2]

[1]Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara - SP, Brasil

[2]Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara - SP, Brasil

Título reduzido: Toxicidade transdentinária da clorexidina

Autor correspondente:

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Departamento de Fisiologia e Patologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

R: Humaitá, 1680 – Centro. CEP: 14801-903, Araraquara - SP

Tel: + 55 (16) 3301 – 6477 / FAX: (16) 3301-6488 / E-mail: casouzac@foar.unesp.br

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos tóxicos transdentinário de diferentes concentrações de clorexidina (CHX) sobre células pulpares em cultura. Para isto, discos de dentina de 0,2mm e 0,5mm foram obtidos de terceiros molares humanos. Após adaptação dos discos em câmaras pulpares artificiais, células MDPC-23 (50.000 células/cm^2) foram cultivadas na superfície pulpar dos discos, sendo que sobre a superfície oclusal foram aplicadas as seguintes concentrações de CHX (n=10): 0,12%; 0,2%; 1%; 2%, bem como ácido fosfórico 35%; e natrosol puro. No grupo controle nenhum produto foi aplicado sobre a dentina. Para cada grupo, 8 discos foram usados para análise do metabolismo celular e 2 discos foram selecionados para avaliação da morfologia celular em MEV. A análise estatística monstrou que o efeito tóxico da CHX para as células odontoblastóides foi dose dependente. A redução percentual do metabolismo celular foi de 12,8%; 14,6%; 18,3%; 26%; 13,7%; e 10,5% para discos de 0,5mm e de 23%; 26,3%; 28,1%; 34,5%; 22,5% e 19,4% para discos de 0,2mm tratados com CHX a 0,12%; 0,2%; 1%; 2%; ácido fosfórico; e natrosol, respectivamente. Foi possível concluir que a CHX é capaz de se difundir pela dentina e causar efeitos citotóxicos de forma dose dependente. A dentina atuou como uma barreira contra a difusão de CHX, sendo que este efeito depende diretamente de sua espessura.

Palavras-chave: Citotoxicidade; clorexidina; odontoblastos

Introdução

Nas últimas décadas, muitas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar as diversas possibilidades de utilização do digluconato de clorexidina, especialmente devido ao seu amplo espectro antimicrobiano.[1-4] Em pH fisiológico, a clorexidina (CHX), na sua forma hidrossolúvel, facilmente se dissocia, liberando moléculas carregadas positivamente. Essas moléculas se adsorvem à parede celular de bactérias, alterando seu equilíbrio osmótico e promovendo o extravasamento de substâncias de baixo peso molecular.[3] Em altas concentrações, o dano torna-se irreversível devido à penetração da CHX nas bactérias e posterior precipitação e coagulação do conteúdo citoplasmático, o que resulta na morte dos microrganismos.[2,5]

Tem sido relatado que a manutenção de um processo inflamatório de etiologia bacteriana pode limitar a reparação tecidual.[6] Na odontologia restauradora atual, a obtenção de um ambiente asséptico previamente à aplicação de agentes forradores e capeadores é importante para a manutenção das condições ideais de reparação do complexo dentino-pulpar. Desta maneira, com o objetivo de eliminar bactérias que porventura permaneçam no interior dos túbulos dentinários após remoção mecânica da dentina cariada, produtos à base de CHX tem sido recomendados para lavagem das paredes cavitárias.[7,8] Atualmente, alguns pesquisadores têm demonstrado que a CHX, quando utilizada após condicionamento ácido da dentina e previamente à aplicação do

adesivo, é capaz de retardar a degradação da interface resina/dentina, prolongando a durabilidade da restauração.[9,10] Este efeito da CHX está relacionado à sua capacidade de inibir a ação das metaloproteinases da matriz de dentina,[11,12] as quais participam efetivamente da degradação da interface resina/dentina após realização de restaurações adesivas. Todavia, um agente recomendado para lavagem de cavidades ou de tecido pulpar exposto deve, entre várias propriedades, apresentar baixo efeito tóxico. Desta maneira, a citotoxicidade da CHX tem sido alvo de várias pesquisas.[3,13-15] Esses estudos demonstraram que a CHX aplicada diretamente sobre células em cultura pode reduzir a síntese protéica e interferir na respiração mitocondrial, inibindo a proliferação celular. Porém, sabe-se que a dentina atua como uma importante barreira contra a difusão de substâncias em direção a polpa dental.[16-18] Estudos in vivo utilizando dentes humanos, demonstraram a relação direta entre a difusão de componentes de materiais odontológicos e a espessura da dentina remanescente entre o assoalho da cavidade e o tecido pulpar.[19,20] Esta relação entre difusão transdentinária e espessura de dentina pode ser explicada, pelo menos em parte, pela variação do número e diâmetro dos túbulos dentinários.[21,22] Sabe-se que os odontoblastos são as primeiras células a entrarem em contato com produtos que conseguem se difundir através da dentina. Isto porque os odontoblastos se organizam em monocamada para revestir internamente a dentina coronária e radicular.[23] Assim, o desenvolvimento de pesquisas de avaliação da citotoxicidade in

vitro que incluem barreira dentinária e células com fenótipo de odontoblasto, passou a ser de grande interesse, pois ajudam a determinar segurança de aplicação clínica dos procedimentos relacionados com a restauração adesiva de cavidades dentárias. Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a capacidade de difusão de diferentes concentrações de CHX através de discos de dentina de 0,5mm e 0,2mm de espessura, determinando seus possíveis efeitos tóxicos sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

Material e Método

Obtenção dos discos de dentina

Discos de dentina com 0,2mm e 0,5mm de espessura foram obtidos de terceiros molares humanos hígidos concedidos pelo Banco de Dentes após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo # 38/06). Os cortes dos dentes para obtenção dos discos de dentina foram realizados com auxílio de uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler, Lake Buff, IL, USA) com disco diamantado acoplado (11-4254, 4”x 0,012”/ série 15LC, Diamond Blade, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, USA), sob refrigeração com água. Os discos de dentina tiveram suas superfícies regularizadas através de desgastes com lixas d’água número 400 e 600 com movimentos giratórios manuais para cada granulação, obtendo-se as espessuras finais de 0,5mm ou 0,2mm (70 discos cada), determinadas

por meio de paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mytutoyo Japan). Após selecionar em lupa esteroscópica (aumento 48X, SZX7 Zoom, Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan), discos de dentina livres de "ilhas" de esmalte ou depressões características dos cornos pulpares, foi realizada a análise da condutância hidráulica (Lp; $\mu L/cm^2/min/cmH_2O$) destes discos.[21] Para isto, a smear layer presente nas superfícies oclusal e pulpar dos discos de dentina cortados foi removida por meio da aplicação, por 120 segundos, da solução de EDTA 0,5M (pH 7,2). Este procedimento, além de preparar os discos de dentina para o teste de condutância hidráulica,[24] também proporciona adequado substrato dentinário para adesão e crescimento celular para a realização de testes de citotoxicidade.[25] Com os dados numéricos de condutância hidráulica estabelecidos, os discos de dentina foram homogeneamente distribuídos dentro dos grupos experimentais e controle, de tal maneira que nenhuma diferença estatisticamente significante ocorresse entre eles (Kruskal Wallis, $p>0,05$).

Câmara pulpar artificial

Para a avaliação da viabilidade celular por meio do teste de difusão transdentinária, foi utilizada uma câmara pulpar artificial (CPA), a qual apresenta 2 compartimentos. No compartimento superior (4mm de altura) há uma abertura de 8mm de diâmetro, enquanto que no compartimento inferior, ocorre uma redução do diâmetro de abertura para 6mm, o que

favorece a correta adaptação do disco de dentina na CPA. Este compartimento inferior apresenta também perfurações circulares laterais, as quais permitem que o meio de cultura permaneça em contato com as células cultivadas sobre a superfície pulpar do disco de dentina.

Cada disco de dentina foi posicionado individualmente na CPA entre dois anéis de silicone (*"o-ring",* Orion – São Paulo, SP, Brasil), de tal maneira que a superfície pulpar do disco foi mantida voltada para o compartimento inferior da CPA. Em seguida, as CPAs com os discos de dentina e os anéis de silicone em posição foram colocadas em recipientes de vidro contendo água deionizada e autoclavadas (121ºC por 20min).

Cultivo das células de linhagem odontoblástica sobre os discos de dentina

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas de acrílico de 75cm^2 (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura α-MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Mmodification, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100IU/mL e 100μg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 e 95% de ar, na temperatura de 37^{o}C. Estas células foram subcultivadas a cada três dias na concentração de 30.000células/cm^2, até se obter o número de células suficiente para a execução do experimento.

Após serem autoclavadas, as CPAs com os discos de dentina em posição foram colocadas, de maneira invertida, em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Desta forma, a superfície pulpar de cada disco foi posicionada para cima, sobre a qual foram cultivadas as células MDPC-23 (50.000células/cm^2). As placas de acrílico com as CPAs foram mantidas por 72 horas em incubadora numa atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 e na temperatura de 37^oC. Completado este período de incubação, as CPAs tiveram suas posições novamente invertidas nos compartimentos, de tal maneira que a superfície pulpar dos discos de dentina, onde as células MDPC-23 estavam aderidas, foi mantida voltada para baixo, em contato com o meio de cultura completo. Desta maneira, foi estabelecida a camada de odontoblastos sobre a superfície pulpar dos discos de dentina, sendo que a superfície oclusal destes mesmos discos permaneceram disponíveis para aplicação dos géis de CHX, ácido fosfórico ou natrosol puro.

Aplicação dos agentes experimentais e controle

Este estudo avaliou o efeito citotóxico transdentinário das seguintes concentrações de CHX preparadas com um gel espessante (natrosol): 0,12%; 0,2%; 1% e 2%, bem como do ácido fosfórico a 35% (Scotchbond™ Etchant, 3M/ESPE, St. Paul, MN, USA) e natrosol puro (Farmácia Escola, UNESP, Araraquara, SP, Brasil). Para isto, os géis

experimentais foram aplicados sobre a superfície oclusal dos discos de dentina com 0,5mm ou 0,2mm de espessura (n=10), os quais estavam adaptados às CPAs e com as células cultivadas sobre a superfície pulpar imersas em meio de cultura completo. Para o grupo controle, nenhum produto foi aplicado, sendo que as células permaneceram em contato com o meio de cultura α-MEM, representando 100% do metabolismo celular. Previamente a aplicação dos agentes experimentais, realizou-se o condicionamento da superfície oclusal de todos os discos de dentina com ácido fosfórico a 35% por 15 segundos, o qual foi removido através de lavagem com 2mL de água destilada esterilizada. Este condicionamento ácido da dentina foi realizado com o objetivo de simular uma situação clínica de restauração adesiva de cavidades, onde a CHX é aplicada sobre a camada de dentina desmineralizada, imediatamente antes da aplicação do sistema adesivo. Um grupo com apenas o condicionamento ácido da dentina foi incluído nesta pesquisa para avaliar a provável participação do ácido fosfórico nos efeitos citotóxicos sobre as células pulpares em cultura. Como o natrosol constitui a base dos géis de CHX utilizados nesta pesquisa, um grupo onde este produto foi aplicado após condicionamento ácido da dentina, também foi incluído na presente pesquisa. Desta maneira foi possível avaliar se algum outro componente dos géis experimentais, que não CHX, poderia causar efeitos tóxicos para as células. Assim, 23mg dos géis de CHX ou natrosol foram aplicados por 60 segundos sobre a superfície dos discos de dentina, sendo então

removidos com auxílio de discos de papel de filtro esterilizados (F. Maia Indústria e Comércio Ltda., Cotia, SP, Brasil). Após estes procedimentos, as CPAs com a superfície oclusal dos discos de dentina tratados foram mantidas em incubadora pelo período de 2 horas.

Avaliação do metabolismo celular

Para a análise da atividade metabólica celular, foram selecionados oito discos de dentina de ambas as espessuras de acordo com cada tipo de tratamento proposto, sendo então realizada a análise colorimétrica do metiltetrazolium (teste de MTT).[26] Este teste é baseado na demonstração citoquímica da enzima desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Assim, após os 120 minutos de incubação, os discos de dentina foram cuidadosamente removidos das CPAs e transferidos, individualmente, com a superfície pulpar voltada para cima, para outra placa de acrílico de 24 compartimentos, contendo 900μL de meio de cultura α-MEM e 100μL de solução de MTT cada, a qual foi preparada através da solubilização do sal de MTT (Sigma Chemical Co., USA) em tampão fosfato (5mg/mL). Após 4 horas de incubação das células em contato com a solução de MTT, esta foi aspirada, sendo então, aplicados 250μL de isopropanol acidificado em ácido clorídrico (HCl) a 0,04N para solubilização dos cristais de formazan, determinando uma coloração violeta de variada intensidade, de acordo com a taxa de metabolismo das células. Em seguida, duas alíquotas de

100μL de cada compartimento foram transferidas para placas de acrílico de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Para a padronização da leitura, os dois primeiros compartimentos destas novas placas foram preenchidos com 100μL da solução de isopropanol acidificado, para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz, ou seja, a redução máxima do metabolismo celular. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570nm em leitor de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader-BIOTEK Instruments, ICC, USA).

Como a análise do metabolismo celular forneceu dados contínuos em distribuição não-normal, o teste não paramétrico de Kruskal Wallis complementado pelo teste de Mann-Whitney foram utilizados com nível de significância de 5% (α=0,05) (SPSS 13.0 for Windows). Os valores numéricos determinados pelo teste de MTT foram convertidos em média calculada para cada grupo e transformados em porcentagem. Os valores percentuais obtidos demonstraram o efeito inibitório da atividade mitocondrial das células de acordo com os tratamentos da dentina. O grupo sem tratamento (controle) foi definido como 100% de metabolismo celular.

Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dois discos de dentina representativos de cada grupo foram selecionados para análise da morfologia das células odontoblastóides

MDPC-23 que permaneceram aderidas sobre o substrato dentinário. Decorridos 2 horas de incubação, os discos foram cuidadosamente removidos das CPAs e transferidos individualmente para outra placa de acrílico de 24 compartimentos, contendo 1mL de glutaraldeído tamponado a 2,5% pelo período de 2 horas. Posteriormente, os discos de dentina com a superfície pulpar voltada para cima foram submetidos à lavagem por três vezes com 1mL de PBS (5 minutos cada lavagem), pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos, sendo então processados para avaliação da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, model DSM-940A, Oberkochen, Germany). A análise da morfologia das células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato dentinário celular foi realizada de forma descritiva.

Resultados

Metabolismo celular (MTT)

Os resultados do metabolismo celular das células MDPC-23 para cada grupo experimental e controle e de acordo com a espessura do disco de dentina estão apresentados na Tabela 1 e Figura 1.

Com relação à espessura do disco de dentina, a análise estatística demonstrou existir diferença significativa quanto ao metabolismo celular entre todos os grupos experimentais, sendo que efeitos citotóxicos mais discretos ocorreram para os discos de 0,5mm ($p<0,05$). Analisando separadamente os grupos dentro da mesma espessura de dentina,

observou-se para discos de 0,5mm, redução de 12,8%; 14,6%; 18,3% e 26% no percentual de metabolismo celular para as concentrações de 0,12%; 0,2%; 1% e 2% de CHX, respectivamente. Para os grupos ácido fosfórico e natrosol, a redução percentual do metabolismo celular foi de 13,7% e 10,5%, respectivamente. Todos os grupos experimentais foram estatisticamente diferentes do grupo controle ($p<0,05$). Não houve diferença estatística entre o grupo do ácido fosfórico e do natrosol puro. Todavia, diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos da CHX ($p<0,05$), caracterizando um efeito tóxico dose dependente deste agente químico experimental.

Para os discos de dentina com 0,2mm de espessura, pôde-se observar significante redução do metabolismo celular quando comparado aos resultados obtidos com discos de 0,5mm de espessura, apesar das distribuições semelhantes ($p<0,05$). Os géis de CHX com concentrações de 0,12%; 0,2%; 1% e 2% provocaram redução percentual de 23%; 26,3%; 28,1% e 34,5% no metabolismo celular, respectivamente. Para os grupos do ácido fosfórico e natrosol, ocorreu redução percentual de 22,5% e 19,4% no metabolismo celular, respectivamente.

Morfologia celular (MEV)

No grupo controle, as numerosas células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato dentinário estavam próximas da confluência e se organizavam em nódulos epitelióides. Estas células, de

maneira individual, exibiam ampla membrana da qual se originavam finos e longos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 2a/b/c).

Assim como observado para a análise do metabolismo celular, a espessura dos discos de dentina também influenciou na morfologia das células MDPC-23 que permaneceram aderidas à superfície de dentina. Assim, quanto menor a espessura dos discos de dentina e maior a concentração de CHX, mais intensas foram as alterações morfológicas nas células. Nos grupos onde se realizou o condicionamento ácido da dentina, seguido ou não da aplicação do natrosol, foi observado discreta redução no número de células que permaneceram aderidas à dentina, sendo que estas células exibiam morfologia semelhante àquelas observadas para o grupo controle (Figura 3a/b). Estas mesmas características ocorreram para os grupos onde foram utilizadas baixas concentrações de CHX. Todavia, as concentrações mais altas de CHX, especialmente quando aplicadas sobre discos de dentina de 0,2mm de espessura, causaram notável redução no número de células que permaneceram aderidas à dentina, sendo que estas células exibiam tamanho reduzido, forma arredondada e com poucos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana (figura 4a/b).

Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos transdentinário de diferentes concentrações de CHX sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Pesquisas utilizando células odontoblastóides imortalizadas mantidas em cultura tornaram-se importante, uma vez que os odontoblastos são as primeiras células que entram em contato com substâncias, que por difusão transdentinária, alcançam a câmara pulpar.[27] Todavia, sabe-se que os resultados de citotoxicidade de materiais odontológicos que utilizam disco de dentina como barreira biológica estão diretamente relacionados com a permeabilidade deste tecido dentário tubular.[28-30] Com o objetivo de eliminar a influência desta variável na avaliação da difusão transdentinária e citotoxicidade da CHX, foi determinado, na presente pesquisa, a permeabilidade de todos os discos de dentina por meio do cálculo de condutância hidráulica (Lp) por filtração. Após obtenção destes dados, foi realizada a distribuição homogênea dos discos de dentina de ambas espessuras dentro dos grupos experimentais e controle, o que tornou os resultados desta pesquisa confiáveis, possibilitando a avaliação comparativa entre os grupos. Assim, foi demonstrado que a aplicação de CHX na concentração de 2% causou redução percentual de 26% e 34,5% no metabolismo das células quando se utilizou discos de dentina de 0,5mm ou 0,2mm de espessura, respectivamente. Em pesquisa recente, Souza et al.[14] (2007) demonstraram a ocorrência de intenso efeito

citotóxico quando baixas concentrações de CHX, tais como 0,0024%, 0,004% e 0,02% foram aplicadas diretamente sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura. Assim, os dados obtidos na presente pesquisa confirmam que a dentina age como uma verdadeira barreira física, a qual protege as células pulpares contra os efeitos tóxicos de materiais odontológicos e/ou seus componentes. Todavia, a dentina não atua como um simples filtro, pois as moléculas liberadas dos materiais, as quais apresentam potencial de se difundir através da dentina, podem se adsorver as paredes internas dos túbulos dentinários ou ao seu conteúdo protéico, o que limita a chegada destes resíduos ao tecido pulpar.[28] Outros estudos demonstraram que a CHX interage com os constituintes orgânicos da dentina, principalmente com proteínas da matriz dentinária,[31,32] sendo que este fato pode ter reduzido a difusão das moléculas de CHX através dos discos de dentina, fazendo com que uma baixa concentração deste agente químico ou produtos de sua degradação tenham alcançado as células MDPC-23. Pode-se especular também que o meio de cultura utilizado na presente pesquisa pode ter penetrado, por capilaridade, no interior dos túbulos dentinários. Este deslocamento do meio de cultura para dentro dos túbulos dentinário pode ter sido favorecido também pela hipertonicidade do gel de ácido fosfórico utilizado para condicionar a superfície oclusal dos discos de dentina.[33,34] Desde que o meio de cultura utilizado na presente pesquisa era suplementado com soro fetal bovino, é possível que tenha ocorrido ligações não

específicas da CHX com as proteínas do soro, limitando a chegada deste agente químico no lado pulpar dos discos de dentina, onde estavam aderidas as células pulpares. Ligações inespecíficas entre agentes químicos tóxicos com proteínas do soro fetal bovino adicionado ao meio de cultura foram anteriormente descritas na literatura.[13] Devemos ainda levar em consideração que numa situação in vivo, outros fatores podem dificultar a difusão da CHX através da dentina, tais como a pressão pulpar positiva, presença física do fluido dentinário e prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos dentro dos túbulos de dentina.[28] Da mesma maneira, a interação dos produtos de difusão com as células pulpares in vivo pode ser diferente daquela apresentada na presente pesquisa, especialmente devido à complexidade das estruturas teciduais, vascularização pulpar, influência hormonal e possível interação das próprias moléculas entre si.[28]

Ao realizar o condicionamento ácido da dentina por 15 segundos com ácido fosfórico a 35%, observou-se uma redução percentual de 13,7% e 22,5% no metabolismo celular, quando se utilizou discos de dentina de 0,5mm ou 0,2mm de espessura, respectivamente. Tem sido relatado que a difusão de íons hidrogênio através dos túbulos dentinários é limitada pelo efeito tampão da dentina através de ligações do fosfato trivalente da hidroxiapatita com os prótons.[34] De acordo com Pashley[34] (1992), os íons hidrogênio e a hipertonicidade dos condicionadores ácidos poderiam causar danos aos odontoblastos quando aplicados em

cavidades muito profundas, gerando uma leve inflamação pulpar imediata. Estes dados foram confirmados na presente pesquisa, onde as espessuras de 0,2mm e 0,5mm simularam cavidades muito profundas, e a aplicação isolada do gel de ácido fosfório 35% causou discreto efeito tóxico para as células odontoblásticas MDPC-23.

Ferraz et al.[7] (2001) avaliaram a desinfecção de canais radiculares com CHX e demonstraram, através da microscopia eletrônica de varredura, que este agente químico na forma de gel é capaz de produzir uma superfície radicular mais limpa, com remoção da smear layer e presença de túbulos abertos quando comparado a CHX solução, onde uma fina camada de smear layer cobrindo os túbulos dentinários estava presente. Na presente pesquisa foi decidido avaliar as diferentes concentrações de CHX preparadas na forma de gel, utilizando o veículo natrosol, o qual é um polímero carbono biocompatível,[35] uma vez que este produto, nesta condição, apresenta consistência adequada para que possa ser aplicado em área limitada da dentina oclusal, diminuindo assim, o risco de escoamento pela lateral dos discos montados na CPA, o que promoveria uma toxicidade direta nas células plantadas na superfície pulpar dos discos. Por ser hidrossolúvel, o gel de natrosol pode ser facilmente removido da dentina.[36]

Além disso, a maioria das substâncias se move pela dentina por difusão simples, a qual varia diretamente com a concentração da substância aplicada. Neste processo, ocorre o deslocamento molecular,

não havendo movimentação de fluido, seguindo o gradiente de concentração.[37] Hanks et al.[38] (1993) demonstraram que a osmolaridade de diferentes géis clareadores não influenciou a difusão transdentinária das moléculas de H_2O_2. Tem sido relatado que peso molecular de uma substância também poderia alterar sua difusão através da dentina.[37] Apesar do elevado peso molecular da CHX (PM = 897,77), foi demonstrado na presente pesquisa, que este agente químico, na forma de gel, foi capaz de permear através dos discos de dentina, corroborando com o estudo de Gondim et al.[39] (2008) onde foi relatado que a solução de CHX 0,2% foi capaz de se difundir através de discos de dentina de 0,5mm de espessura.

Para ambas as espessuras dos discos de dentina, o efeito citotóxico observado após condicionamento ácido da dentina seguido ou não da aplicação de natrosol não foi estatisticamente diferente. Este dado demonstrado na presente pesquisa confirma que o natrosol é um produto biocompatível. Desta maneira, pode-se sugerir que o efeito tóxico dose dependente demonstrado para diferentes concentrações experimentais de CHX preparadas com natrosol se deva especificamente ao agente químico em estudo.

Metaloproteinases (MMPs) são enzimas dependentes de cálcio e zinco que regulam o metabolismo fisiológico e patológico dos tecidos que contém colágeno.[40] Estas enzimas presentes na dentina podem participar da degradação das fibrilas de colágeno da base da camada de dentina

desmineralizada, quando esta não é completamente preenchida por resina durante a restauração adesiva de cavidades.[41-43] Esta ação das MMPs da dentina acelera a degradação da camada híbrida, o que pode interferir na longevidade da restauração dentária.[9,10] Porém, sabe-se que a CHX é um ótimo inibidor sintético de MMPs, mesmo em concentrações muito baixas.[12] A utilização de CHX 2% após condicionamento ácido da dentina tem demonstrado, in vivo, a preservação da integridade da rede de fibrilas de colágeno deste tecido[9] e a manutenção dos valores de resistência de união após 14 meses de realizada a restauração adesiva das cavidades dentárias.[10] Estes estudos realizados em dentes humanos suportam a utilização da CHX na odontologia restauradora adesiva, pois além de atuar no controle das bactérias que permanecem no interior dos túbulos dentinários após remoção mecânica da cárie, este agente químico também pode prolongar a vida útil de restaurações adesivas. Todavia, a presente pesquisa demonstrou que a concentração de CHX atualmente recomendada para lavagem de cavidades pode causar importante efeito tóxico transdentinário, principalmente quando aplicado em cavidades muito profundas. Apesar de não ser recomendado extrapolar resultados de pesquisa in vitro para situações clínicas in vivo,[44,45] as pesquisas laboratoriais, especialmente àquelas que utilizam discos de dentina como barreira biológica, têm auxiliado na compreensão dos mecanismos de ação de vários materiais dentários, colaborando na determinação de sua segurança de aplicação clínica. Estes estudos in vitro evitam que a saúde

de seres humanos seja diretamente colocada em risco. Desta maneira, outras pesquisas deverão ser realizadas para esclarecer os mecanismos que envolvem a inibição das MMPs da dentina pela CHX, a possibilidade de difusão de CHX contra pressão pulpar positiva, bem como qual seria a concentração ideal de CHX para inibir a ação das MMPs sem, contudo, causar efeitos tóxicos para as células pulpares.

Conclusão

De acordo com as condições experimentais, foi possível concluir que a clorexidina, aplicada em diferentes concentrações sobre discos de dentina de 0,2mm e 0,5mm de espessura, exerce efeito citotóxico transdentinário dose dependente sobre células de linhagem odontoblastóide MDPC-23. O efeito citotóxico da CHX é inversamente proporcional a espessura da barreira de dentina interposta entre o gel experimental e as células pulpares em cultura.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grants: 476137/2006-3 e 301029/2007-5) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Os autores agradecem também a contribuição do Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, da Universidade de São Paulo (USP), coordenado pelo Prof. Dr. Elliot W. Kitajima.

REFERÊNCIAS

1. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. J Periodontol 1973;12:68-75.
2. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. J Am Dent Assoc 1986;112:863-9.
3. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. Toxicol In Vitro 2001;15:271-6.
4. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int Endod J 2003;36:75-85.
5. Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of Excherichia coli and Staphylococcus aureus. J Pharm Pharmacol 1966;18:569-78.
6. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 2002;13:171-83.
7. 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;27:452-5.
8. de Castro FL, Andrade MF, Duarte-Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of chlorhexidine on microtensile bond strength of composite

to dentin. J Adh Dent 2003;5:129-38.

9. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. J Dent Res 2005;84:741-46.
10. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. J Dent Res 2007;86:529-33.
11. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res 1998;77:1622-29.
12. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagnost Lab Immunol 1999;6:437-39.
13. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. J Periodontol 1999;70:1443-8.
14. Souza LB, Aquino SG, Souza PPC, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine to the odontoblast cell line MDPC-23. Am J Dent 2007; 20:400-404.
15. 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 l929 fibroblasts. J Endod 2007;33:715-22.

16. Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. J Oral Pathol 1988;17:396-403.
17. Schmalz G, Garhammer P, Schweiki H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. J Endod 1996;22:249-52.
18. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. J Endod 2005;31:396-9.
19. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of bonding agent in deep cavities. Dental Mat 2002;18:543-551.
20. Costa CAS, Giro EMA, do Nascimento AB, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulp-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. Dental Mat 2003;19:739-746.
21. Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. Oper Dent Suppl 1984;3:13-29.
22. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. J Dent 1997;25:355-72.
23. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:1367-73.

24. Martineli ACBF. Avaliação da eficácia de agentes anti-hiperestésicos: métodos clínicos e laboratoriais. Rev Fac Odontol Bauru 2001;9:157-166.
25. Costa CAS, Hanks CT. Capacity of L929 and BALB/C 3T7 fibroblasts to survive on human dentin discs. Braz Endod J 1998;3:7-13.
26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
27. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. Dent Mat 1999;15:434-41.
28. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. J Oral Rehabil 1994;21:475-87.
29. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. J Endod 1996;22:244-8.
30. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. J Dent 1996;24:125-8.
31. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine,

hydroxylapatite and bovine serum albumin. Int Endod J 2001;34:184-8.

32. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against Enterococcus faecalis by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. J Endod 2002;28:634-7.
33. Macko DJ, Rutberg M, Langeland K. Pulpal response to the application of phosphoric acid to dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1978;45:930-46.
34. Pashley DH. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. Oper Dent 1992;17:229-42.
35. Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. J Biomed Mater Res 1989;23:125-33.
36. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J 2007;18:294-8.
37. Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. Int Endod J 1988;21:143-54.

38. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. Dent Res. 1993 May;72:931-8.
39. Gondim JO, Duque C, Hebling J, Giro EM. Influence of human dentine on the antibacterial activity of self-etching adhesive systems against cariogenic bacteria. J Dent 2008;36:241-248.
40. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res 2006;85:22-32.
41. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2003;66:324-30.
42. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2003;66:287-98.
43. Yoshida E, Hashimoto M, Hori M, Kaga M, Sano H, Oguchi H. Deproteinizing effects on resin-tooth bond structures. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2004;68:29-35.
44. Stanley HR. Biological evaluation of dental materials. Int Dent J 1992;42:37-46.
45. Schmalz G. Materials science: biological aspects. J Dent Res 2002;81:660-3.

Tabela 1. Valores de absorbância correspondente ao metabolismo celular obtidos no teste de MTT para cada grupo e espessura de dentina.

Grupos	Espessura de dentina	
	0,2mm	**0,5mm**
CHX 0,12%	0,178 (0,015) a, A*	0,191 (0,018) b, AB
CHX 0,2%	0,171 (0,014) a, B	0,187 (0,023) b, B
CHX 1%	0,167 (0,023) a, B	0,179 (0,021) b, C
CHX 2%	0,152 (0,028) a, C	0,162 (0,030) b, D
Ácido fosfórico	0,180 (0,014) a, AD	0,189 (0,018) b, AB
Ácido + Natrosol	0,187 (0,013) a, D	0,196 (0,022) b, A
α-MEM	0,232 (0,055) a, E	0,219 (0,041) a, E

* Valores representam medianas (intervalo) (n=8). As medianas seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas indicam grupos que não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

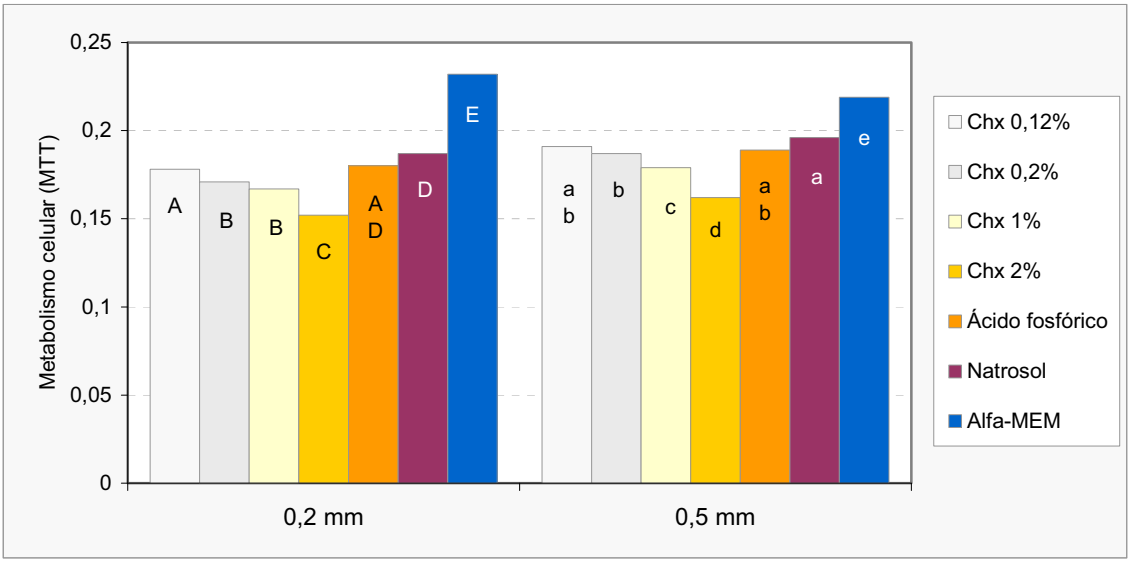


Figura 2. Representação gráfica dos valores de produção da enzima desidrogenase succínica, detectados pelo teste de MTT, para os grupos em função da espessura do disco de dentina. Barras representam medianas e as identificadas com a mesma letra indicam ausência de diferença estatística entre os grupos para cada espessura de dentina (Mann-Whitney, p>0,05).

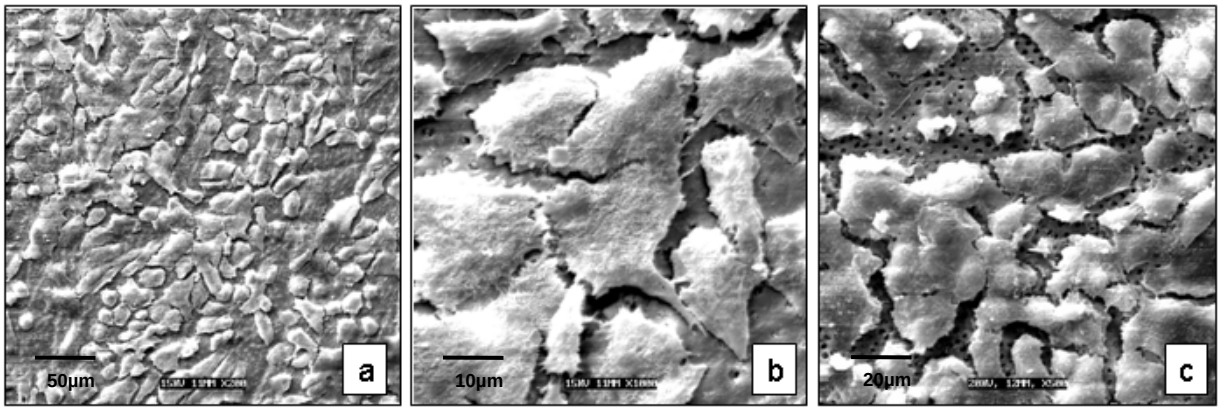


Figura 3. Grupo controle α-MEM. **a:** disco de 0,5mm, MEV 200x: Grande número de células MDPC-23 aderidas ao disco de dentina, as quais estão próximas da confluência, e com tendência de se organizar em nódulos epitelóides. **b**: disco de 0,5mm, MEV 1000x: Células exibiam forma alongada com amplo citoplasma. Numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos se originam da membrana celular. **c:** disco de 0,2mm, MEV 500x: Assim como observado na figura 3a, numerosas células MDPC-23 próximas da confluência e com ampla membrana citoplasmática estão aderidas ao substrato dentinário.

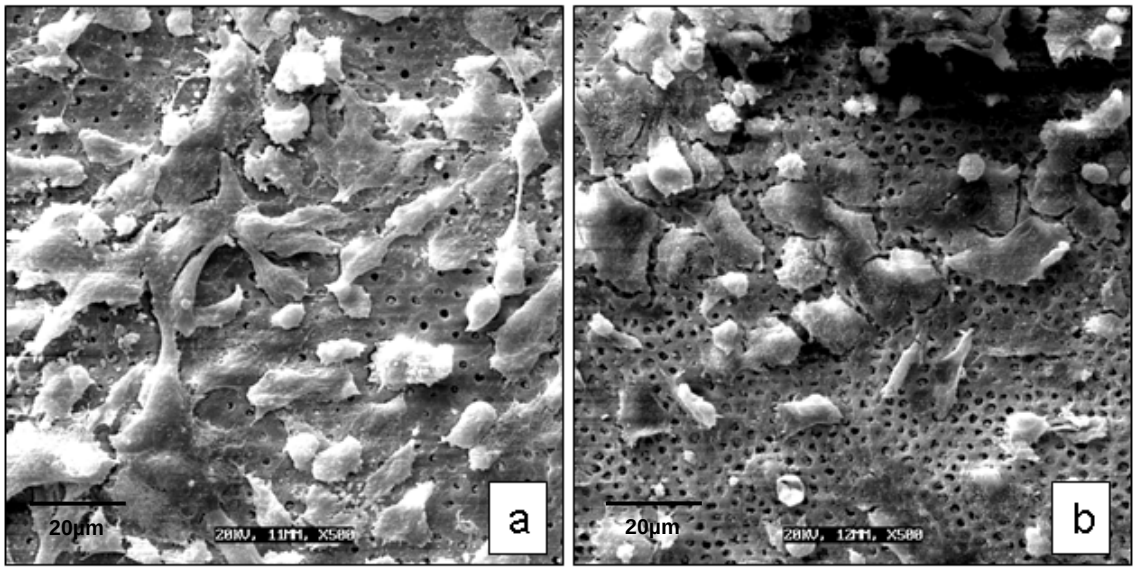


Figura 4a. Grupo natrosol, disco de 0,5mm, MEV 500x: Menor número de células permaneceu aderida ao disco de dentina quando comparado ao controle. Observe algumas poucas células exibem alterações de sua morfologia. **b:** Grupo ácido fosfórico, disco de 0,2mm, MEV 500x: Algumas células com características semelhantes ao grupo controle podem ser observadas, porém em menor quantidade. Note algumas células com morfologia arredondada, sendo que restos de membrana citoplasmática de células que morreram e se deslocaram do substrato ainda podem ser vistos entre os túbulos dentinários.

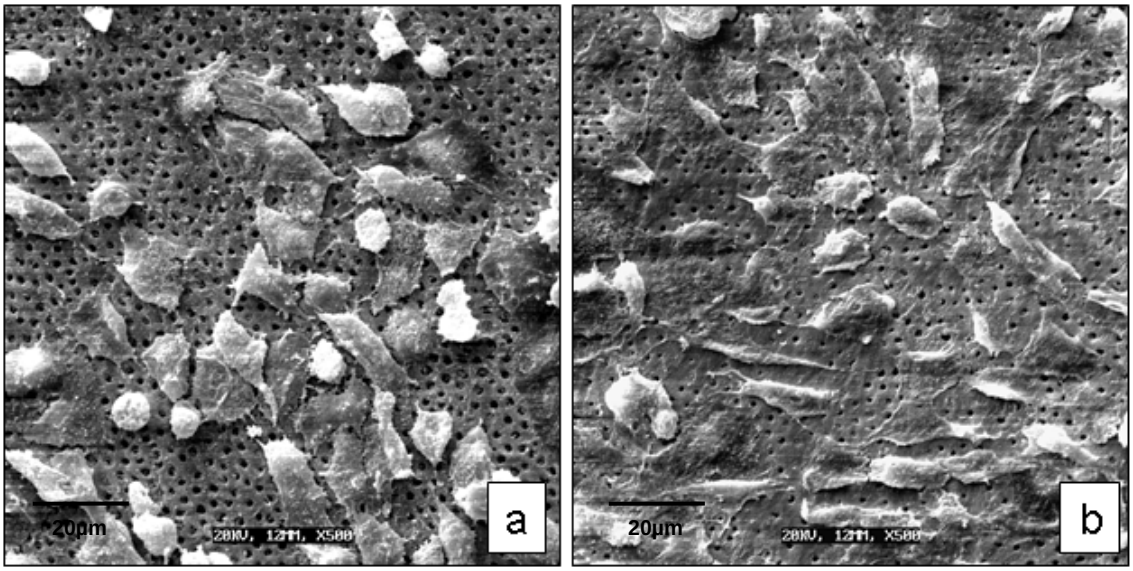
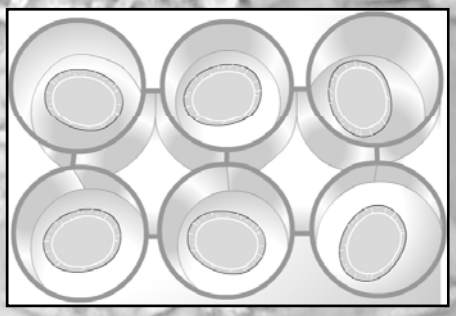
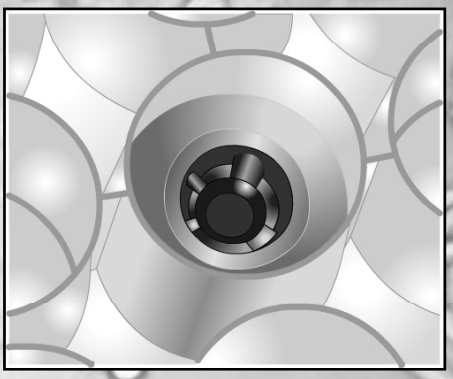
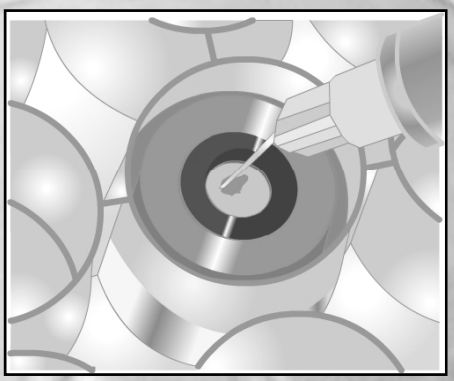


Figura 5a. Grupo CHX 2%, disco de 0,5mm, MEV 500x: Menor número de células MDPC-23 pode ser observado. Algumas células apresentam tamanho reduzido, morfologia arredondada e com poucos prolongamentos citoplasmáticos em sua membrana. **5b**.Grupo CHX 2%, disco de 0,2mm, MEV 500x: Poucas células com características morfológicas alteradas podem ser observadas. Note que as células que ainda permaneceram sobre a dentina reduziram significantemente a amplitude de sua membrana, se tornando células pequenas, algumas vezes com morfologia arredondada.

Avaliação in vitro da atividade antibacteriana direta e transdentinária da clorexidina







Artigo 3

Avaliação in vitro da atividade antibacteriana direta e transdentinária da clorexidina

F. C. R. Lessa[1], I. Nogueira[1], F. S. Vargas[2], D. M. P. Spolidorio[2], J. Hebling[1], C. A. S. Costa[2].

[1]Departamento de Clínica Infantil, e [2]Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara - SP, Brasil

Running Title: Efeito antibacteriano direto e indireto da clorexidina

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, Clorexidina, Permeabilidade dentinária, *S. mutans.*

Autor correspondente:

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa
Departamento de Fisiologia e Patologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
R: Humaitá, 1680 – Centro. CEP: 14801-903, Araraquara - SP
Tel: + 55 (16) 3301 – 6477 / FAX: (16) 3301-6488 / E-mail: casouzac@foar.unesp.br

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano direto e indireto, através da difusão transdentinária, de diferentes concentrações de clorexidina (CHX). **Metodologia:** Foi utilizado o teste de difusão em ágar sobre *S. mutans*. No método direto, os grupos foram constituídos de CHX gel 0,12%; 0,2%; 1% e 2%; gel de natrosol e ácido fosfórico 35% (n=6), os quais foram inseridos em poços confeccionados na camada base. Para o grupo controle positivo, utilizou-se água destilada esterilizada em discos de papel. No método indireto, discos de dentina de 0,2mm e 0,5mm (36 discos cada) foram obtidos de terceiros molares humanos hígidos. Sobre cada placa contendo meio BHI Ágar e 10^9UFC/ml de *S. mutans,* foram depositados 6 discos de dentina (1 por grupo) os quais foram posicionados em pontos eqüidistantes e com a superfície pulpar voltada para o ágar. Realizou-se o condicionamento ácido da superfície oclusal de todos os discos, seguida de lavagem e aplicação dos géis por 1 minuto. Após incubação das placas por 24 horas, os halos de inibição produzidos em torno dos poços e discos de dentina foram mensurados com um paquímetro digital. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. **Resultados:** No método direto, todas as concentrações de CHX avaliadas demonstraram potencial antibacteriano numa forma dose dependente. No método indireto, os grupos avaliados apresentaram ser estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$) com maior halo de inibição produzido pela CHX 2% no disco de 0,2mm de

espessura. **Conclusão:** Pode-se concluir que todos os géis de CHX avaliados possuem atividade antibacteriana direta e trandentinária sobre *S.mutans*. Este efeito da CHX é fortemente influenciado por sua concentração e também pela espessura da barreira de dentina.

Introdução

A clorexidina (CHX) tem sido amplamente utilizada em diversos procedimentos odontológicos por apresentar comprovado potencial antimicrobiano (Fardal & Turnbull 1986). Sua efetividade é verificada contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo as bactérias Gram positivas e Gram negativas, esporos bacterianos, vírus lipofílicos, leveduras e dermatófitos (Hauman & Love 2003). A CHX, sendo uma molécula catiônica, é capaz de adsorver-se à membrana das bactérias, unindo-se à moléculas carregadas negativamente para alterar a permeabilidade desta estrutura, o que promove o extravasamento de substâncias de baixo peso molecular. Em altas concentrações, o dano à membrana torna-se irreversível, havendo a penetração da CHX e posterior precipitação de componentes intracelulares microbianos (Hugo & Longworth 1966).

Devido a complexidade anatômica dos canais radiculares, resíduos orgânicos e bactérias que não foram removidos pelo preparo mecânico realizados com instrumentos endodônticos podem ser encontrados nos túbulos dentinários (Ferraz *et al.* 2001). Assim, vários autores têm

avaliado a atividade antimicrobiana da CHX como medicamento intracanal e como irrigante endodôntico (Ferraz *et al.* 2001, Basrani *et al.* 2002, Gomes *et al.* 2003, Dametto *et al.* 2005, Sena *et al.* 2006, Ferraz *et al.* 2007). Segundo Ferraz *et al.* (2001) a CHX é capaz de desinfetar canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* in vitro.

No campo da Odontologia restauradora, sabe-se que as bactérias que permanecem no interior dos túbulos dentinários após remoção mecânica de cárie e a possível infiltração posterior de microrganismos na interface dente-restauração, são os principais fatores desencadeadores de lesões de cárie secundárias e conseqüente injúria pulpar (Bergenholtz *et al*. 1982, Murray *et al*. 2002). A presença de um processo inflamatório de etiologia bacteriana na área da polpa relacionada com o assoalho cavitário pode interferir no processo de reparação tecidual ou até mesmo potencializar os efeitos citotóxicos de certos materiais odontológicos utilizados em procedimentos clínicos (Cox *et al.* 1985, Watts & Paterson 1987). Assim, a utilização de substâncias antibacterianas para lavagem de paredes cavitárias após remoção de lesões de cárie, torna-se necessária para obtenção de um ambiente asséptico previamente à aplicação de agentes forradores e capeadores, mantendo as condições ideais para reparação do complexo dentino-pulpar.

A dentina é considerada uma importante barreira contra a difusão de componentes residuais de materiais odontológicos ou de bactérias e seus produtos em direção a polpa. Sabe-se que este processo de difusão

transdentinária pode ser facilitada à mediada em que a cavidade dentária se aproxima da polpa, uma vez que o número de túbulos por milímetro quadrado e seu diâmetro interno aumenta com a profundidade do tecido dentinário (Love & Jenkinson 2002). Assim, um estudo analisando se variadas concentrações de CHX utilizadas como agente de lavagem cavitária mantém seu efeito antibacteriano através de diferentes espessuras de dentina seria importante, visto que dentro deste contexto, o agente de lavagem poderia manter um ambiente asséptico ideal para permitir a adequada reparação do complexo dentino-pulpar. Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o potencial antibacteriano de diferentes concentrações da clorexidina sobre *S.mutans* por meio do teste de difusão em ágar (teste direto) e através da difusão transdentinária (teste indireto).

Material e método

Teste de difusão em ágar: aplicação direta

A atividade antibacteriana de diferentes concentrações do gel de CHX, gel de natrosol e gel de ácido fosfórico 35% foi avaliada, in vitro, por meio do teste de difusão em ágar (n=6), utilizando-se cepa padrão *Streptococcus mutans (*UA159).

Para a realização deste teste, *S. mutans* foram inicialmente semeados em caldo BHI (Brain Heart Infusion, BHI^{TM}, Difco Laboratories, Detroit, MI) e mantidos por 24 horas a 37ºC, em condições de microaerofilia. A partir dessa cultura, inoculou-se 15µL de *S. mutans* em

caldo BHI, mantido por 24 horas a 37ºC, para obtenção do inóculo de aproximadamente 10^9UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL), correspondente a escala nº 8 de McFarland.

Para o teste de difusão, preparou-se uma camada base contendo 15mL do meio de cultura BHI ágar acrescido de 300µL do inóculo 10^9UFC/mL de *S. mutans*. Após a solidificação do meio de cultura nas placas de Petri, poços medindo 4,7mm de diâmetro foram confeccionados em pontos eqüidistantes da placa, com o auxílio de canudos de plástico previamente desinfetados com álcool 70% por 24 horas. Para avaliação da atividade antibacteriana, de acordo com cada grupo proposto, seis poços foram preenchidos com as seguintes concentrações de um gel de CHX: 0,12%; 0,2%; 1%; e 2% (Farmácia Escola, UNESP, Araraquara, SP, Brasil). Outros seis poços foram preenchidos com ácido fosfórico 35% gel (Scotchbond™ Etchant, 3M/ESPE, St. Paul, MN) ou gel de natrosol (usado como base para preparação do gel de CHX). Para o grupo controle positivo, utilizou-se água destilada esterilizada em discos de papel de 4mm de diâmetro.

Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 horas, a 37ºC em condições de microaerofilia em jarra de anaerobiose (Permution, EG Krieger & Cia LTDA, Curitiba, Brasil). Os halos de inibição produzidos em torno dos poços e discos de papel para cada uma das unidades experimentais foram mensurados em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mytutoyo Japan). Estas

mensurações foram realizadas em duas regiões, sendo considerado o maior diâmetro no sentido horizontal e vertical, formado ao redor de cada poço, incluindo a medida do diâmetro do poço. A partir dos valores numéricos obtidos em mm, foram calculadas as médias, obtendo-se assim, o diâmetro do halo de inibição. Os números obtidos dos halos de inibição foram submetidos à análise estatística.

Teste de difusão em ágar: aplicação indireta

Setenta e dois terceiros molares humanos hígidos foram obtidos no Banco de Dentes após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo # 38/06). Restos de ligamento periodontal foram removidos mecanicamente da superfície dos dentes, os quais foram armazenados em glutaraldeído a 2,5% por um período máximo de 6 meses. Os cortes foram realizados com auxílio de uma cortadeira metalográfica de precisão (ISOMET 1000, Buehler, Lake Buff, USA) com disco diamantado acoplado (11-4254, 4”x 0,012”/ série 15LC, Diamond Blade, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, USA), sob refrigeração com água. Cortes seqüenciais foram realizados até que fosse obtida uma superfície plana em dentina sem a presença evidente de projeções dos cornos pulpares ou “ilhas” de esmalte.

Os discos de dentina tiveram suas superfícies regularizadas por meio de desgastes com lixas d’água número 400 e 600 com movimentos giratórios manuais para cada granulação, obtendo-se as espessuras finais

de 0,5mm ou 0,2mm (36 discos cada), determinadas por meio de paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mytutoyo Japan). Em seguida avaliou-se a permeabilidade (condutância hidráulica) dos discos de dentina com o intuito de se obter uma distribuição homogênea dos mesmos nos grupos experimentais e controle, eliminando a influência desta variável na avaliação do efeito antibacteriano. Para isto, a remoção da smear layer que permaneceu sobre a superfície dos discos cortados foi realizada com EDTA 0,5M, pH 7,2 (por 120 segundos) nas duas superfícies dos discos de dentina, seguido da lavagem com água deionizada esterilizada. Este procedimento teve como objetivo a limpeza superficial dos discos de dentina, promovendo a desobstrução dos túbulos dentinários, padronizando, desta forma, os espécimes para o teste de permeabilidade (Martinelli *et al.* 2001). Após determinada a condutância hidráulica, os discos de dentina de ambas as espessuras foram divididos nos grupos experimentais e controle (Kruskal Wallis, $p>0,05$) e em seguida foram autoclavados (121ºC por 20min).

Para a realização do teste de difusão em ágar por aplicação indireta e utilizando *S. mutans (*UA-159), placas de Petri esterilizadas contendo camada base com 15mL de BHI ágar foram utilizadas. Uma alíquota de 250µL do inóculo foi espalhada sobre a camada base com o auxilio de uma haste de vidro esterilizada. Sobre cada placa, foram depositados 6 discos de dentina medindo 8mm de diâmetro (1 por grupo)

de cada espessura (0,2mm e 0,5mm) posicionados a cerca de 30mm das bordas das placas e em pontos eqüidistantes.

Avaliou-se a atividade antibacteriana através da difusão transdentinária dos mesmos géis analisados anteriormente (CHX 0,12%; 0,2%; 1%; 2% e gel de ácido fosfórico 35%). Para o grupo controle, foi utilizada água destilada esterilizada (n=6). Para simular uma situação clínica de restauração adesiva de uma cavidade dentária, foi realizado o condicionamento da superfície oclusal dos discos de dentina com o gel de ácido fosfórico 35% por 15 segundos, seguida de lavagem com 2mL de água destilada esterilizada com concomitante aspiração através de seringa Pasteur acoplada em bomba de vácuo. Em seguida, os géis experimentais de CHX foram aplicados por 1 minuto sobre a superfície oclusal da dentina desmineralizada, sendo então removidos com auxílio de discos de papel filtro esterilizados. Após realizado esses procedimentos, com os discos de dentina posicionados numa bandeja metálica esterilizada, os mesmos foram então colocados nas placas inoculadas com a superfície pulpar voltada para o ágar. Estas placas foram então incubadas a 37^{o}C por 24 horas em condições de microaerofilia em jarra de anaerobiose. Os halos de inibição produzidos em torno dos discos de dentina para cada uma das unidades experimentais foram medidas como descrito anteriormente para o método de difusão direta. Os valores numéricos referentes às médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidos para cada material (n=6) foram

avaliados quanto à distribuição e homogeneidade de variâncias. Como a análise forneceu dados contínuos em distribuição não-normal, o teste não paramétrico de Kruskal Wallis complementado com o teste de Mann-Whitney foi realizado ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) (SPSS 13.0 for Windows).

Resultados

Para o método de avaliação direta, os valores dos halos de inibição obtidos para cada material testado estão apresentados na Tabela 1.

As concentrações de CHX avaliadas demonstraram potencial antibacteriano numa forma dose dependente. As concentrações de 0,12% e 0,2% não apresentaram diferença estatisticamente significante entre si, assim como as concentrações de 1% e 2% ($p>0,05$). O gel de natrosol revelou não possuir atividade antibacteriana. Dentre os materiais avaliados neste estudo, o ácido fosfórico apresentou maior efeito antimicrobiano, como demonstrado na Figura 1.

Os resultados obtidos dos halos de inibição produzidos pelos materiais avaliados após difusão transdentinária estão apresentados na Tabela 2.

Todos os grupos avaliados apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si ($p<0,05$), com formação de maior halo de inibição para a CHX 2% aplicada sobre discos de dentina com 0,2mm de espessura. Considerando-se apenas a espessura dos discos de dentina, quando

utilizados discos de 0,5mm, a concentração de CHX 0,12% revelou não possuir atividade antibacteriana, enquanto que as demais concentrações de CHX apresentaram valores de inibição estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). Com relação aos discos de 0,2mm de espessura, as concentrações de 0,12% e 0,2% de CHX foram estatisticamente semelhantes ($p>0,05$), assim como as concentrações de 1% e 2%.

Quando aplicado sobre discos de dentina de diferentes espessuras, o ácido fosfórico revelou não possuir atividade antibacteriana, tal como demonstrado na Figura 2.

Discussão

Dentina e polpa são tecidos especializados que devido as suas origens, caracterizam o complexo dentino-pulpar, o qual na região de coroa e raiz é revestido por esmalte e cemento, respectivamente (Goldberg *et al.* 1995). Em casos de desenvolvimento de lesões de cárie cavitadas que atingem a dentina, túbulos dentinários desprotegidos proporcionam verdadeiros canais para difusão de bactérias e seus produtos (Bergenholtz 1981). Mediante a invasão bacteriana através dos túbulos, inicia-se uma resposta inflamatória pulpar, a qual resulta em aumento de pressão de exudação do fluído dentinário (Maita *et al.* 1991). Quando a invasão bacteriana é extensa e supera as defesas inerentes do complexo dentino-pulpar, uma infecção da polpa e do sistema de canais radiculares pode ocorrer, levando a perda deste tecido conjuntivo especializado. Desta forma, a remoção mecânica da dentina infectada e

utilização de agentes com propriedades antibacterianas e capacidade de ação à distância no interior da dentina contaminada, deveria ser empregados em procedimentos clínicos de tratamento de lesões de cárie. Estes agentes de lavagem de cavidades deveriam apresentar potencial de manter o substrato dentinário em melhores condições de assepsia para permitir adequada restauração adesiva da cavidade, o que favoreceria o processo de reparação do complexo dentino-pulpar. Todavia, o importante efeito antimicrobiano dos agentes de limpeza cavitária em profundidade na dentina, não deveria resultar em danos pulpares devido à intensa difusão de componentes tóxicos destes produtos. Consequentemente, concentrações adequadas de CHX necessitam ser avaliadas quando aplicadas em diferentes espessuras de dentina com o objetivo de se conhecer seu potencial de difusão transdentinária, o que possibilitaria a futura análise dos efeitos citotóxicos destes agentes sobre células pulpares. No presente estudo, o efeito antibacteriano direto e transdentinário de diferentes concentrações de CHX foram avaliados. No teste indireto, foi demonstrado que a espessura do remanescente dentinário influenciou o efeito da CHX sobre *S. mutans*. Halos de inibição maiores se formaram quando da aplicação de CHX 2% sobre a superfície oclusal de discos de dentina de 0,2mm de espessura. Os grupos avaliados foram estatisticamente diferentes entre si com relação as concentrações de CHX. Avaliando-se apenas a espessura dos discos de dentina, verificou-se que houve diferença estatística entre todos os discos

de 0,5mm, enquanto que no grupo de 0,2mm, as concentrações de 0,2% e 0,12% diferenciaram das concentrações de 1% e 2%. O método de difusão em ágar empregado na presente pesquisa, no qual foram utilizados discos de dentina como barreira entre os produtos testados e as bactérias cultivadas, tem sido amplamente utilizado por outros pesquisadores (Schmalz *et al.* 2004, Ergucu *et al.* 2005, Gondim *et al.* 2008). Para a realização deste método é importante a avaliação prévia da permeabilidade dos discos de dentina, o que permite uma distribuição homogênea destes discos dentro dos grupos experimentais e controle, determinando a obtenção de resultados confiáveis.

A microbiota cariogênica consiste principalmente de estreptococos, lactobacilos e actinomices. Membros dos estreptococos do grupo mutans como o *S. mutans* e *S. sobrinus* são considerados os agentes etiológicos primários na indução de lesões de cárie coronária e radicular (Bowden 1990, van Houte 1994, Marchant *et al.* 2001). Desta forma, *S. mutans* foi escolhido para o inoculo neste estudo. O efeito antibacteriano da CHX por meio do método de difusão em ágar direto revelou ser dose dependente. Apesar da dificuldade em se comparar resultados utilizando-se este teste, principalmente devido às diferenças de metodologia, tais como a quantidade de microrganismos inoculados e tipo de meio de cultura utilizado, os resultados da presente pesquisa corroboram com àqueles previamente apresentados por Basrani *et al.* (2003), os quais relataram a

formação de halos de inibição semelhantes após aplicação do gel de CHX 2% e 0,2% diretamente em contato com *S. mutans.*

O gel de natrosol, usado como veículo para preparação das diferentes concentrações de CHX avaliadas neste estudo, é um polímero carbono biocompatível (Miyamoto *et al.* 1989). Este produto é um agente espessante não iônico hidrossolúvel, o qual pode ser facilmente removido da dentina com um jato de água destilada (Ferraz *et al.* 2007). Desde que o gel de natrosol é biocompatível e na presente pesquisa foi determinado, através do teste direto de difusão em ágar, que este produto não apresenta atividade antibacteriana, foi decidido então, não avaliar o mesmo pelo teste de difusão transdentinária. Por outro lado, foi demonstrado neste estudo que o ácido fosfórico 35% gel revelou ser um excelente agente antibacteriano direto para *S. mutans*, corroborando com o estudo de Settembrini *et al.* (1997), os quais avaliaram diferentes marcas comerciais de ácido fosfórico e verificaram a formação de amplos halos de inibição para a mesma bactéria. Esses autores também avaliaram o efeito antimicrobiano de espécimes de esmalte e dentina condicionados e lavados por 20 segundos e posteriormente colocados nas placas de ágar inoculadas. Os autores concluíram que houve formação de halos de inibição ao redor dos espécimes, porém, menores que os halos formados quando da aplicação direta dos agentes ácidos experimentais sobre as bactérias cultivadas. Todavia, na presente pesquisa foi demonstrado, por meio do teste indireto (difusão

transdentinária), que o ácido fosfórico 35% gel não apresenta atividade antimicrobiana sobre *S. mutans*, independente da espessura do disco de dentina utilizado. Provavelmente, o efeito tampão da dentina (Pashley 1992) tenha neutralizado o ácido fosfórico aplicado sobre os discos, evitando que este agente pudesse alcançar os microrganismos que estavam em contato com a superfície pulpar dos mesmos discos. Desta maneira, foi possível determinar que apenas o gel de CHX foi responsável pelo efeito antibacteriano transdentinário observado na presente pesquisa, quando da aplicação do produto sobre a superfície oclusal do disco de dentina previamente condicionado com ácido fosfórico.

Na presente pesquisa foi decidido avaliar as diferentes concentrações de CHX preparadas na forma de gel, uma vez que o produto, nesta condição, apresenta consistência adequada para que possa ser aplicado em área limitada da dentina oclusal, diminuindo assim, o risco de escoamento pela lateral dos discos, quando da realização do teste indireto, Além disso, a maioria das substâncias se move pela dentina por difusão simples, a qual varia diretamente com a concentração da substância aplicada. Neste processo, ocorre o deslocamento molecular, não havendo movimentação de fluido (Pashley 1988). Também, tem sido relatado que a CHX na forma de gel e líquida apresentam a mesma eficácia frente a espécies de bactérias anaeróbias facultativas e Gram-negativos (Ferraz *et al.* 2007). Esses autores demonstraram que a atividade antibacteriana do gel de CHX observada no teste de difusão em

ágar revelou uma tendência a formação de halos de inibição mais amplos do que àqueles observados quando da aplicação de CHX em solução; porém esta diferença não foi estatisticamente significante. O gel de CHX também demonstrou ser capaz de desinfetar canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* e manter uma superfície dentinária limpa para posterior obturação dos condutos (Ferraz *et al.* 2001). Os autores relataram que as propriedades mecânicas do gel de CHX promovem uma melhor limpeza mecânica do canal radicular comparado a solução, removendo debris dentinários e remanescentes teciduais.

Há vários anos, a CHX tem sido avaliada como agente de lavagem de paredes cavitárias, sendo que o interesse neste agente químico se tornou ainda maior após ter sido demonstrado na literatura que mesmo baixas concentrações de CHX tem a capacidade de inibir a ação das metaloproteinases (Gendron *et al.* 1999), as quais participam da degradação da interface resina/dentina (Hebling *et al.* 2005, Carrilho *et al.* 2007). Consequentemente, quando do procedimento clínico de restauração adesiva de cavidades, a aplicação de CHX sobre a dentina desmineralizada com ácido fosfórico, e imediatamente antes da aplicação do agente adesivo, não interfere na penetração do agente adesivo na camada de dentina desmineralizada (de Castro *et al.* 2003) e retarda o processo de degradação da camada híbrida (Hebling *et al.* 2005, Carrilho *et al.* 2007), prolongando a vida útil da restauração. Com o objetivo de

simular esta situação clínica, na presente pesquisa, as diferentes concentrações de CHX foram aplicadas sobre o substrato dentinário somente após este tecido ter sido condicionado por 15 segundos com ácido fosfórico gel 35%, o qual foi removido da superfície da dentina através de lavagem com água destilada esterilizada.

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que quanto menor a espessura do remanescente dentinário, maior a atividade antibacteriana transdentinária da CHX, especialmente para a concentração de 2% do produto. Todavia, a significante difusão desta elevada concentração de CHX através da dentina poderia também causar danos às células pulpares, os quais poderiam ser mais graves quanto maior a concentração do produto que alcança este tecido conjuntivo especializado. Estes efeitos adversos podem ser ainda mais graves quando o produto for aplicado em cavidades muito profundas, cujo remanescente dentinário entre o assoalho da cavidade e a polpa é delgado. Nesta situação, elevada concentração do produto pode alcançar o espaço pulpar, particularmente devido ao grande número de túbulos dentinários do local e seu amplo diâmetro interno. Assim, futuras pesquisas necessitam ser desenvolvidas in vitro e in vivo para determinar a concentração ideal, capaz de eliminar microrganismos e inibir metaloproteinases da dentina sem causar efeitos tóxicos para as células pulpares.

Conclusão

De acordo com as condições experimentais deste estudo, foi possível concluir que o gel de CHX apresenta efeito antibacteriano direto sobre *S.mutans* de maneira dose dependente. O método indireto de difusão em ágar (teste transdentinário) demonstrou que a espessura do remanescente dentinário influenciou o efeito da CHX, ocorrendo halos de inibição maiores quando utilizado CHX 2% no disco de 0,2mm de espessura.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (476137/2006-3 e 301029/2007-5). Os autores agradecem a contribuição das técnicas de laboratório Juliana Pirola Garcia e Sonia da Silveira Vargas na realização da parte experimental deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L *et al*. (2002) Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **94,** 240-5.
2. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM *et al*. (2003) Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments

against Enterococcus faecalis in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **96,** 618-24.

3. Bergenholtz G (1981) Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *Journal of Endodontics* **7**, 100-4.
4. Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA (1982) Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *Journal of Oral Pathology* **11,** 439-50.
5. Bowden GH (1990) Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque. *Journal of Dental Research* **69** (Special Number), 653-9.
6. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, *et al.* (2007) In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *Journal of Dental Research* **86,** 529-33.
7. Cox CF, Bergenholtz G, Heys DR, Syed SA, Fitzgerald M, Heys RJ (1985) Pulp capping of dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 years observartion of wound healing in the monkey. *Journal of Oral Pathology* **14**, 156-168.
8. Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ (2005) In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against Enterococcus faecalis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **99,** 768-72.

9. de Castro FL, Andrade MF, Duarte-Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ (2003) Effect of chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *Journal of Adhesive Dentistry* **5**, 129-38.
10. Ergücü Z, Hiller KA, Schmalz G (2005) Influence of dentin on the effectiveness of antibacterial agents. *Journal of Endodontics* **31**, 124-9.
11. Fardal O, Turnbull RS (1986) A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal of American Dental Association* **112**, 863-9.
12. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2007) Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Brazilian Dental Journal* **18,** 294-8.
13. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001) In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics* **27**, 452-5.
14. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D (1999) Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* **6**, 437-39.
15. Goldberg M, Septier D, Lécolle S *et al.* (1995) Dental mineralization. *International Journal of Developmental Biology* **39**, 93-110.

16. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC *et al.* (2003) Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. *International Endodontic Journal* **36**, 267-75.
17. Gondim JO, Duque C, Hebling J, Giro EM (2008) Influence of human dentine on the antibacterial activity of self-etching adhesive systems against cariogenic bacteria. *Journal of Dentistry* **36**, 241-248.
18. Hauman CHJ, Love RM (2003) Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International Endodontic Journal* **36**, 75-85.
19. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR (2005) Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *Journal of Dental Research* **84**, 741-46.
20. van Houte J (1994) Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research* **73**, 672-81.
21. Hugo WB, Longworth AR (1966) The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of Excherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **18**, 569-78.

22. Love RM, Jenkinson HF (2002) Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **13**, 171-83.

23. Maita E, Simpson MD, Tao L, Pashley DH (1991) Fluid and protein flux across the pulpodentine complex of the dog in vivo. *Archives of Oral Biology* **36,** 103-10.

24. Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D (2001) The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Research* **35**, 397-406.

25. Martineli ACBF (2001) Avaliação da eficácia de agentes anti-hiperestésicos: métodos clínicos e laboratoriais. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru* **9**, 157-166.

26. Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y (1989) Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *Journal of Biomedical and Material Research* **23**, 125-33.

27. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF (2002) Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dental Materials* **18**, 470-8.

28. Pashley DH (1988) Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *International Endodontic Journal* **21**,143-54.

29. Pashley DH (1992) The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Operative Dentistry* **17**, 229-42.

30. Schmalz G, Ergücü Z, Hiller KA (2004) Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *Journal of Endodontics* **30**, 352-8.
31. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME *et al.* (2006) In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *International Endodontic Journal* **39**, 878-85.
32. Settembrini L, Boylan R, Strassler H, Scherer W (1997) A comparison of antimicrobial activity of etchants used for a total etch technique. *Operative Dentistry* **22**, 84-8.
33. Watts A, Paterson RC (1987) Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **64**, 466-474.

Tabela 1. Valores dos halos de inibição (em milímetros) obtidos através da aplicação direta dos géis de CHX, ácido fosfório e natrosol sobre *S. mutans* (método do poço).

Grupos	**Halo de inibição (mm)***
CHX 0,12%	18,9 (17,8-19,3) C
CHX 0,2%	19,5 (18,6-20,2) C
CHX 1%	21,7 (21,5-21,8) B
CHX 2%	22,2 (21,7-22,8) B
Ácido fosfórico	30,8 (28,1-33,9) A
Natrosol	0
Controle	0

* Valores representam medianas (quartis 25/75) (n=6)

** Grupos representados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

Tabela 2. Valores dos halos de inibição (em milímetros) obtidos para *S. mutans* produzidos pelos grupos experimentais em função da espessura dos discos de dentina.

Grupos	**Espessura de dentina**	
	0,5 mm	**0,2 mm**
CHX 0,12%	0	9,6 (0-11,0)* b**
CHX 0,2%	0 (0-9,8) B, c	10,0 (9,7-10,3) A, b
CHX 1%	10,8 (10,1-21,3) B, b	13,5 (12,7-14,7) A, a
CHX 2%	12,6 (12,4-14,2) B, a	15,2 (13,0-16,2) A, a
Ácido fosfórico	0	0
Controle	0	0

* Valores representam medianas (quartis 25/75) (n=6)

** Dentro dos grupos (linhas), valores representados por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente; dentro da espessura de dentina (colunas), valores representados por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

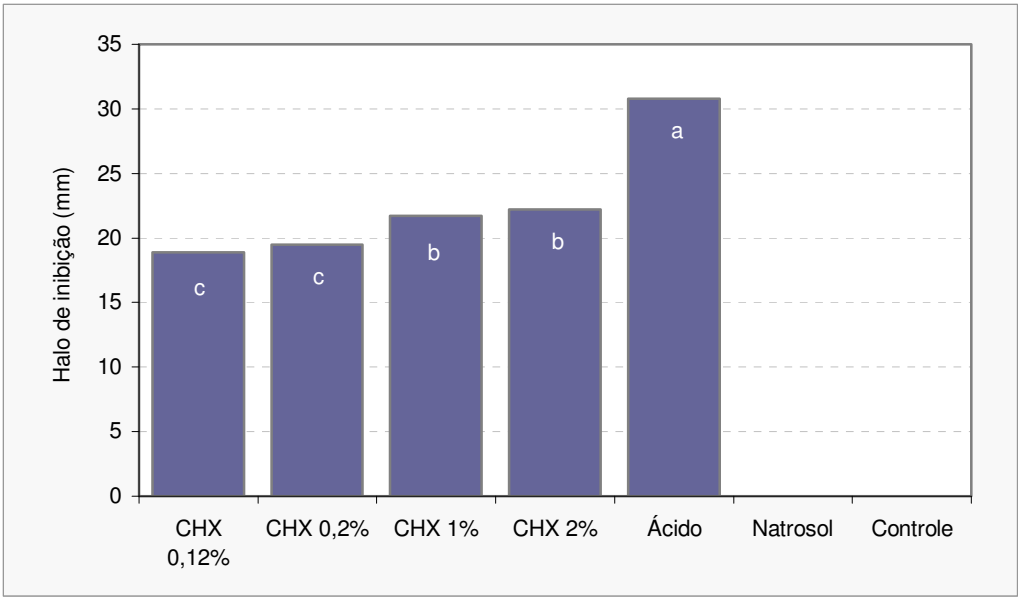


Figura 1. Representação gráfica dos valores dos halos de inibição (mm) obtidos para *S. Mutans* para os grupos experimentais e controles. Barras representam medianas e as identificadas com a mesma letra indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (Mann-Whitney, p>0,05)

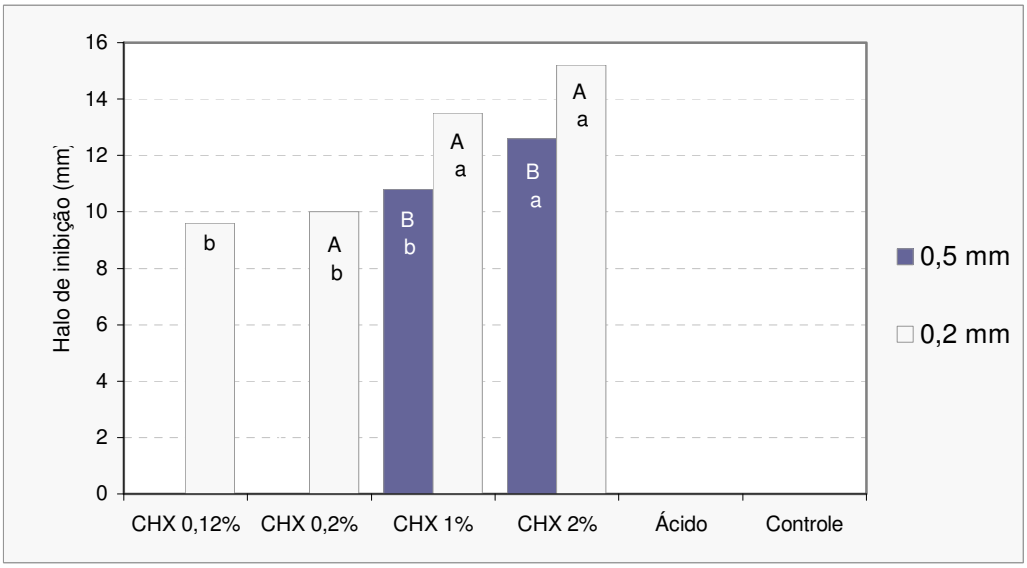
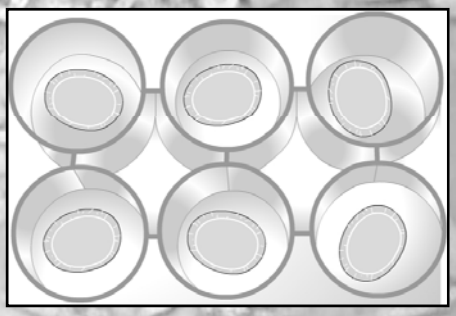
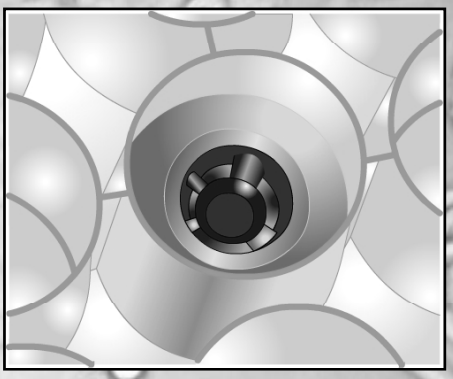
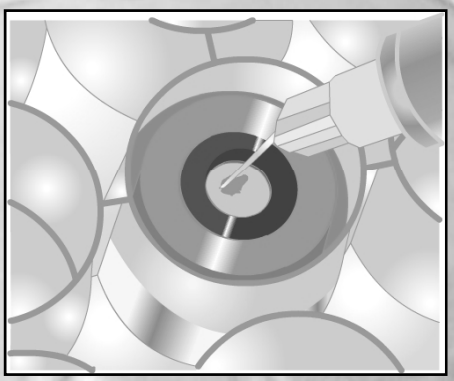


Figura 2. Representação gráfica dos valores dos halos de inibição (mm) obtidos para *S. Mutans* para os grupos experimentais e controles em função da espessura do disco de dentina. As barras representam medianas, sendo que àquelas identificadas com a mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatística entre as espessuras de dentina para cada grupo, assim como as representadas com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre os grupos para cada espessura de dentina (Mann-Whitney, p>0,05).

CONSIDERAÇÕES FINAIS







CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há vários anos, a CHX tem sido avaliada como agente de lavagem de paredes cavitárias após remoção de cárie localizada em dentina. Isto tem ocorrido, em parte, devido a comprovada propriedade antibacteriana deste agente químico, a qual auxilia na manutenção das condições assépticas do substrato dentinário para posterior restauração cavitária. O interesse na CHX se tornou ainda maior após o estudo de Gendron et al.[17] (1999), onde ficou demonstrado que mesmo baixas concentrações deste agente químico apresentam capacidade de inibir a ação das metaloproteinases, as quais participam da degradação da interface resina/dentina[2,23], prolongando a vida útil das restaurações adesivas.

Todavia, a significante difusão da CHX através da dentina poderia também causar danos às células pulpares, sendo que estes danos podem ser mais graves quanto maior concentração deste agente químico alcança o espaço pulpar. Pode-se sugerir que os efeitos adversos da CHX também podem ser mais intensos quando o produto for aplicado em cavidades muito profundas, cujo remanescente dentinário entre o assoalho da cavidade e a polpa é delgado. Assim, tentando esclarecer os possíveis efeitos negativos da CHX, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o metabolismo de células odontoblastóides expostas diretamente ou através de difusão transdentinária (indiretamente) à diferentes concentrações de CHX. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível verificar que a CHX reduziu o metabolismo

celular numa forma dose e tempo dependentes, e que a dentina atuou como uma barreira biológica semi-permeável, protegendo as células odontoblastóides dos efeitos tóxicos da CHX. A diminuição da espessura dentinária acarretou em valores citotóxicos mais elevados para a CHX, sendo que maiores halos de inibição para *S. mutans* se formaram, caracterizando o efeito antibacteriano transdentinário deste agente químico.

A aplicação direta da CHX sobre células pulpares em cultura causou intenso efeito tóxico. De maneira geral, a aplicação das concentrações de 0,06%; 0,12%; 0,2%; 1,0% e 2,0% de CHX diretamente sobre as células MDPC-23 causou redução percentual de 61%, 63%, 65%, 67% e 70% no metabolismo celular, respectivamente. Assim, pode-se especular que a CHX não seria um agente ideal para limpeza e assepsia do tecido pulpar exposto. Esse intenso efeito tóxico direto observado para a CHX foi notavelmente reduzido pela interposição de discos de dentina, cuja espessura interferiu no metabolismo das células pulpares MDPC-23. Houve uma redução percentual de 12,8%; 14,6%; 18,3%; e 26% no metabolismo celular quando foram utilizados discos de 0,5mm de espessura, sendo que esta redução foi de 23%; 26,3%; 28,1% e 34,5% quando utilizados discos de 0,2mm tratados com CHX a 0,12%; 0,2%; 1%; e 2%, respectivamente. Com relação ao efeito antibacteriano após difusão transdentinária, houve formação de maior halo de inibição produzido pela CHX 2% no disco de dentina com espessura de 0,2mm.

O ácido fosfórico apresentou maior efeito antibacteriano direto dentre os materiais avaliados. Entretanto, nenhuma atividade antibacteriana quando o ácido na forma de gel foi aplicado sobre os discos de dentina. Redução percentual de 13,7% e 22,5% no metabolismo celular foi observada quando o ácido fosfórico foi aplicado isoladamente por 15 segundos sobre discos de dentina de 0,5mm e 0,2mm, respectivamente. Considerando o efeito citotóxico, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo do ácido fosfórico e o grupo do gel de natrosol. Foi demonstrado também que o gel de natrosol não apresenta atividade antimicrobiana sobre *S mutans*. Porém, redução percentual de 10,5% e 19,4% no metabolismo celular ocorreu quando o natrosol foi aplicado em discos de dentina de 0,5mm e 0,2mm, respectivamente.

Alterações na morfologia das células MDPC-23 após contato direto e indireto com a CHX foram observadas em microscopia eletrônica de varredura. De uma forma geral, foi observado no grupo controle negativo, que as células MDPC-23 apresentavam-se próximas da confluência e organizadas em nódulos epitelióides. Semelhante característica histológica, porém com uma redução no número de células que permaneceu aderido ao substrato dentinário, ocorreu quando concentrações mais baixas de CHX foram aplicadas por curto período de tempo sobre discos de dentina mais espessos (0,5mm). Nas concentrações mais elevadas de CHX, algumas células apresentam

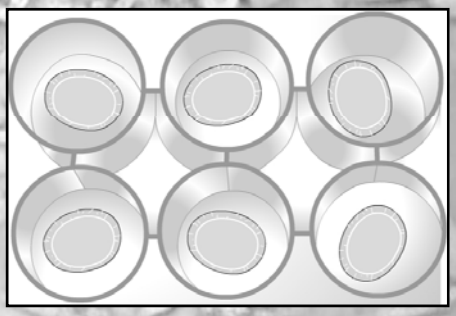
tamanho reduzido, morfologia arredondada e com poucos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Áreas com ausência de células e grande número de debris de membrana de células mortas foram observados. De maneira geral, nos grupos onde houve grande perda de células da superfície de dentina associada às significantes alterações morfológicas das células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato, também ocorreu intensa redução no metabolismo celular. Este fato demonstrou que as alterações morfológicas e morte celular aconteceram devido ao efeito citotóxico transdentinário da CHX ou de produtos de sua degradação. Semelhantes alterações morfológicas, características de danos químicos letais para as células MDPC-23 também foram anteriormente demonstradas[5,6].

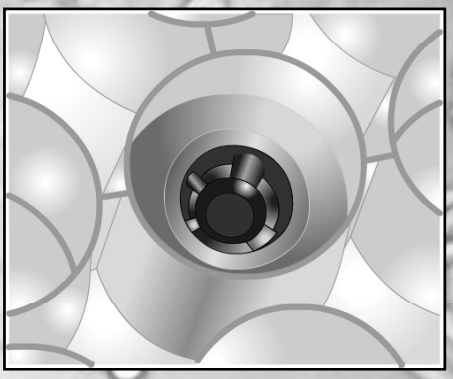
Pesquisas in vitro têm auxiliado na compreensão dos mecanismos de ação de vários materiais dentários e suas diferentes características. Os estudos que incluem barreiras dentinárias nos auxiliam a compreender como a difusão de produtos ou resíduos liberados de materiais dentários, através deste tecido tubular, pode interferir na chegada de moléculas à polpa e seu conseqüente efeito sobre as células locais ou outros tecidos. Porém, de acordo com as Associações e Federações responsáveis pela estandardização dos testes de propriedades biológicas de novos materiais e técnicas, os testes de citotoxicidade in vitro são testes iniciais, os quais são necessários para que possa dar seqüência aos testes in vivo, com animais de experimentação[33,39]. Esses testes são utilizados

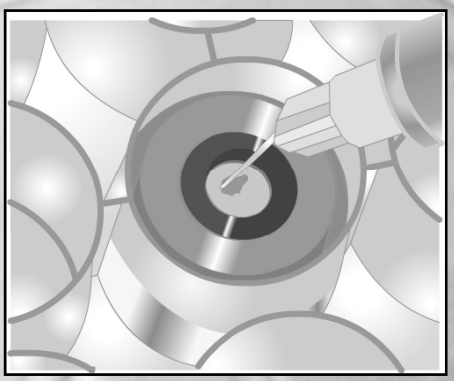
para comparar condições de aplicação de materiais e predizer sua segurança de trabalho. Entretanto, deve-se levar em consideração que um material altamente citotóxico in vitro, pode não apresentar risco aos tecidos, órgãos ou corpo, pois diversos fatores podem participar da resposta celular in vivo, tais como a complexidade das estruturas teciduais, vascularização, condição hormonal e interação das moléculas entre si[21]. Desta forma, os resultados obtidos por testes de citotoxicidade in vitro apresentam limitações e não devem ser diretamente extrapolados para condições clínicas[33,39].

Assim, futuras pesquisas necessitam ser desenvolvidas in vitro e in vivo para determinar a concentração ideal de CHX capaz de eliminar microrganismos cariogênicos e inibir metaloproteinases da dentina, sem causar efeitos tóxicos para as células pulpares em cultura ou para o complexo dentino-pulpar dos pacientes.

CONCLUSÃO





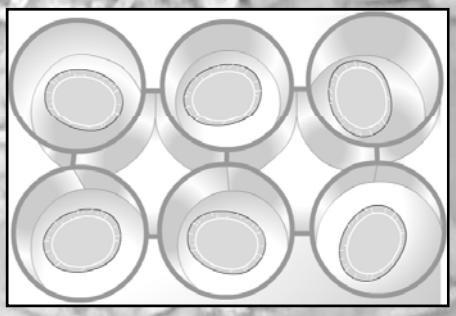


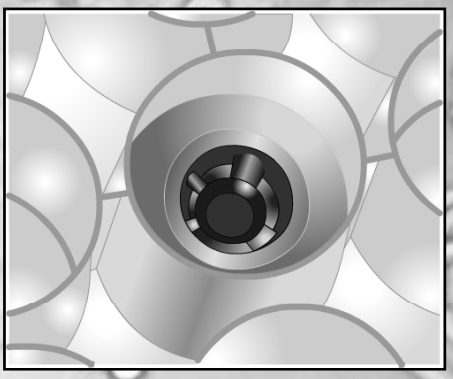
CONCLUSÃO

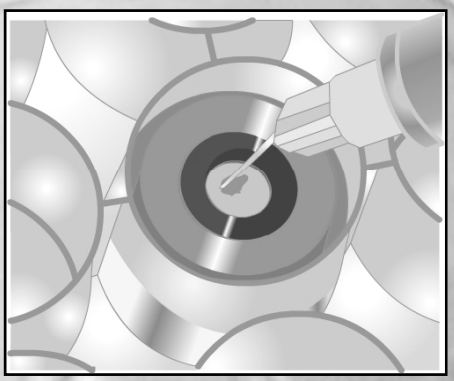
Baseado nos resultados obtidos na presente pesquisa, foi possível concluir que:

- ✓ Soluções aquosas de CHX em diferentes concentrações, quando aplicadas diretamente e por variado período de tempo sobre células odontoblastóides MDPC-23 causam efeitos tóxicos de maneira dose e tempo dependentes.
- ✓ Apesar da dentina atuar como uma verdadeira barreira biológica protetora, foi demonstrado que diferentes concentrações de CHX aplicadas sobre discos de dentina de 0,2mm e 0,5mm de espessura resultou em difusão transdentinária do agente químico ou de seus produtos de degradação, o que causou efeitos citotóxicos de maneira dose-dependente sobre as células MDPC-23 em cultura.
- ✓ O gel de CHX apresenta efeito antibacteriano direto sobre *S.mutans* de maneira dose dependente. O método indireto de difusão em ágar (teste transdentinário) demonstrou que a espessura do remanescente dentinário influenciou no efeito da CHX, ocorrendo formação de halos de inibição maiores quando CHX 2% foi aplicado sobre disco de dentina de 0,2mm de espessura.

REFERÊNCIAS







REFERÊNCIAS*

1. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94: 240-5.
2. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. J Dent Res. 2007; 86: 529-33.
3. de Castro FL, Andrade MF, Duarte-Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. J Adh Dent. 2003; 5: 129-38.
4. Cervone F, Tronstad L, Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. Endod Dent Traumatol. 1990; 6: 33-6.
5. Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleasing solutions recomended for chemical lavage of pulp exposures. Am J Dent. 2001; 14: 25-30.
6. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. Dent Mat. 1999; 15: 434-41.

** De acordo com o Estilo Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html*

7. Cox CF, Bergenholtz G, Heys DR, Syed SA, Fitzgerald M, Heys RJ. Pulp capping of dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 years observartion of wound healing in the monkey. J Oral Pathol. 1985; 14: 156-68.
8. D' Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. J Endod. 1999; 25: 351-3.
9. Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida 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: 768-72.
10. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. J Periodontol. 1973; 12: 68-75.
11. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scand J Dent Res. 1977; 85: 255-65.
12. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. J Am Dent Assoc. 1986; 112: 863-9.
13. 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 l929 fibroblasts. J Endod. 2007; 33: 715-22.

14. 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: 452-5.
15. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J. 2007; 18: 294-8.
16. Franco CF, Pataro AL, Souza LCR, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. Artif Organs. 2003; 27: 486-91.
17. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagnost Lab Immunol. 1999; 6: 437-9.
18. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003; 36: 267-75.
19. Greenstein G, Polson A. The role of local drog delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. J Periodontol. 1998; 69: 507-20.
20. Hanks CT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. Connect Tissue Res. 1998; 37: 233-49.

21. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. J Oral Rehabil. 1994; 21: 475-87.

22. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int Endod J. 2003; 36: 75-85.

23. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. J Dent Res. 2005; 84: 741-6.

24. Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. J Periodontol Res. 1973; 8(suppl.): 61-7.

25. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. Toxicol In Vitro. 2001; 15: 271-6.

26. Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of Excherichia coli and Staphylococcus aureus. J Pharm Pharmacol. 1966; 18: 569-78.

27. Kasugai S, Adachi M, Ogura H. Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of the rat incisor. Arch Oral Biol. 1988; 33: 887-91.

28. Kawase T, Sato S, Miake K, Saito S. Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. Adv Dent Res. 1988; 2: 234-9.

29. MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. Connect Tissue Res. 1995; 33: 97-103.
30. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. J Periodontol. 1999; 70: 1443-8.
31. Önçağ Ö, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. Int Endod J. 2003; 36: 423-32.
32. Rölla G, Löe H, Schiöt CR. The affinity of chlorhexidine for hydroxiapatite and salivaris mucins. J Periodontal Res. 1970; 5: 90-5.
33. Schmalz G. Materials science: biological aspects. J Dent Res. 2002; 81: 660-3.
34. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J. 2006; 39: 878-85.
35. Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Ozielik B, Kuraner T. Comparison of the citotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. J Oral Sci. 2001; 43: 233-8.

36. Shteyer A, Gazit D, Binderman I, Bab IA. Hormone-responsive cells derived from human dental papilla: characterization in vitro and in vivo in diffusion chambers. In Vitro Cell Dev Biol. 1987; 23: 15-20.
37. Souza LB, Aquino SG, Souza PPC, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine to the odontoblast cell line MDPC-23. Am J Dent. 2007; 20: 400-4.
38. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CAS. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. Dent Mat. 2006; 22: 838-44.
39. Stanley HR. Biological evaluation of dental materials. Int Dent J. 1992; 42: 37-46.
40. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res. 1998; 77: 1622-9.
41. Watts A, Paterson RC. Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1987; 64: 466-74.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 18 de agosto de 2008.

FERNANDA CAMPOS ROSETTI LESSA