

NILTON AZAMBUJA JUNIOR

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

São Paulo
2012

NILTON AZAMBUJA JUNIOR

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

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2012

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

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

Azambuja Junior, Nilton.

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

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

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

Versão Corrigida.

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

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

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Sempre serei extremamente grato por tudo que fez por mim.

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES pela bolsa de doutorado.

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

