

## EFEITO DO DIGLUCONATO DE CLOROHEXIDINA NO COMPORTAMENTO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL DE CULTURAS DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS PROVENIENTES DE OSSO ALVEOLAR HUMANO

CRISTINA TRIGO CABRAL\*, MARIA HELENA RAPOSO FERNANDES\*\*

### RESUMO

Apresentam-se neste trabalho resultados relativos ao estudo do efeito da clorhexidina (CHX) em culturas de células osteoblásticas obtidas de osso alveolar humano. Pequenos fragmentos de osso alveolar, obtidos durante procedimentos cirúrgicos na cavidade oral, foram cultivados em " $\alpha$ -Minimum Essential Medium" ( $\alpha$ -MEM) enriquecido com 10% de soro bovino fetal, gentamicina (50  $\mu$ g/ml), penicilina-estreptomicina (respectivamente, 100 IU/ml e 100  $\mu$ g/ml) e anfotericina B (2,5  $\mu$ g/ml) à temperatura de 37° C, numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. A migração celular a partir dos fragmentos ósseos observou-se após 15-20 dias. As células da 1ª subcultura foram cultivadas na presença de ácido ascórbico (50  $\mu$ g/ml),  $\beta$ -glicerofosfato de sódio (10 mM) e dexametasona (10 nM), em situação controlo e na presença de várias concentrações de clorhexidina (0,01  $\mu$ g/ml - 100  $\mu$ g/ml), durante 28 dias. As culturas foram caracterizadas relativamente à adesão celular, proliferação celular e actividade da fosfatase alcalina. Os resultados obtidos mostraram que a clorhexidina tem um efeito directo em culturas de células osteoblásticas obtidas de osso alveolar humano. A presença de 0,01 e 0,1  $\mu$ g/ml de clorhexidina resultou num aumento de 20 a 30% na proliferação/viabilidade celular e actividade da fosfatase alcalina. No entanto, níveis de CHX iguais ou superiores a 1  $\mu$ g/ml provocaram um efeito inibitório nestes parâmetros, dependente da dose. Nas culturas expostas a 100  $\mu$ g/ml observou-se morte celular imediata.

**Palavras chave:** Clorhexidina, osso alveolar humano, culturas de células osteoblásticas.

### ABSTRACT

This work describes the results concerning the study of the effect of chlorhexidine (CHX) in osteoblastic cultures obtained from human alveolar bone. Bone fragments, obtained from oral surgery procedures, were cultured in  $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, gentamicin (50  $\mu$ g/ml), penicillin-streptomycin (respectively, 100 IU/ml and 100  $\mu$ g/ml) and amphotericin B (2.5  $\mu$ g/ml) at 37° C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Cell growth from the bone fragments was observed after 15-20 days. First subculture cells were cultured in the presence of ascorbic acid (50  $\mu$ g/ml),  $\beta$ -glycerophosphate (10 mM) and dexamethasone (10 nM) in control conditions and in the presence of several concentrations of CHX (0.01  $\mu$ g/ml - 100  $\mu$ g/ml) for 28 days. Control and treated cultures were characterised concerning cell adhesion, cell growth and alkaline phosphatase activity. The results showed that CHX has a direct effect in osteoblastic cell cultures obtained from human alveolar bone. The presence of 0.01 and 0.1  $\mu$ g/ml CHX resulted in 20 to 30% increase in cell proliferation and alkaline phosphatase activity. However, levels of 1  $\mu$ g/ml or higher resulted in a dose-dependent inhibitory effect on these parameters. In the presence of 100 mg/ml cell death was immediate.

**Key words.** Chlorhexidine, human alveolar bone, osteoblastic cell cultures.

\*Médica Dentista, Estudante de Doutoramento na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Assistente da Disciplina de Periodontologia no ISCS-Norte.

\*\*Regente da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

## INTRODUÇÃO

A clorohexidina (CHX) é um agente antimicrobiano tópico que tem actividade sobre bactérias Gram-positivo, Gram-negativo e *Candida Albicans*. É um composto catiónico e a sua ligação a grupos aniónicos na superfície das bactérias provoca uma alteração da estrutura da membrana celular e conseqüente destruição da barreira osmótica bacteriana; adicionalmente, a CHX causa precipitação das proteínas plasmáticas<sup>(1, 25, 28, 32, 38)</sup>. Este anti-séptico tem um efeito microbicida<sup>(28, 32)</sup>. A elevada eficácia antimicrobiana da CHX é principalmente devida a características farmacocinéticas especiais que se traduzem pela retenção do composto na cavidade oral (película adquirida, placa bacteriana, mucosa oral) e a sua gradual libertação; esta característica é designada de substantividade<sup>(28, 32)</sup>.

A CHX é amplamente utilizada como agente antimicrobiano, devido às características do seu espectro de acção, tolerabilidade e ausência de desenvolvimento de resistência microbiana. Em Medicina Dentária tem múltiplas aplicações clínicas, sendo utilizada em várias formulações farmacêuticas (por exemplo, colutórios, soluções de irrigação, preparações de libertação prolongada), em diferentes concentrações e por períodos de tempo variáveis, dependendo do objectivo terapêutico. Na concentração de 0,2% (Europa) e 0,12% (USA) é muito eficaz na redução da flora oral patogénica, tendo assim um papel importante na prevenção e tratamento de situações patológicas de etiologia bacteriana<sup>(7, 21-24, 26, 28-30, 32-34)</sup>.

A utilização da maioria das preparações de CHX, por exemplo colutórios e soluções de irrigação, implica o contacto das células da cavidade oral – células do epitélio oral, fibroblastos, células ósseas – com concentrações elevadas deste anti-séptico por períodos de tempo curtos. Relativamente a este aspecto, há uma variedade de estudos que mostram que a

CHX, nas concentrações usadas clinicamente, tem um efeito citotóxico significativo em diversos tipos de células em cultura, nomeadamente, células sanguíneas<sup>(19)</sup>, queratinócitos<sup>(14, 15, 36)</sup>, fibroblastos<sup>(2, 5, 9, 14, 15, 36)</sup>, osteoblastos e osteoclastos<sup>(4)</sup> e macrófagos<sup>(31)</sup>. A maioria destes estudos diz respeito ao efeito de CHX em situações experimentais em que as células em cultura são expostas ao anti-séptico por períodos curtos, da ordem dos minutos a horas. A caracterização do efeito da CHX em culturas de células ósseas tem sido pouco estudada. Bhandari e col. mostraram que a exposição de culturas de osteoblastos provenientes de calvária de rato a uma concentração de 4% CHX por períodos de 2 a 20 minutos resulta numa diminuição significativa da densidade celular. Estes autores verificaram ainda que o contacto destas culturas com soluções de CHX mais diluídas (0,04% e 0,4%) durante 2 minutos afecta negativamente a expressão de parâmetros funcionais osteoblásticos<sup>(4)</sup>.

Há vários estudos que mostram que as culturas celulares de osso alveolar humano mantidas por períodos longos (21 a 35 dias) e efectuadas na presença de ácido ascórbico e β-glicerofosfato expressam níveis elevados de fosfatase alcalina, enzima segregada pelos osteoblastos, e apresentam capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, o evento que traduz a expressão completa do fenótipo osteoblástico<sup>(11, 16, 17, 27)</sup>. A presença adicional de dexametasona provoca um aumento da expressão dos parâmetros osteoblásticos<sup>(11, 16, 17)</sup>. As culturas celulares de osso alveolar têm sido utilizadas como um modelo *in vitro* para o estudo do efeito de fármacos que afectam o tecido ósseo e de outros aspectos biológicos relevantes de interacção em que estão envolvidas as células ósseas<sup>(11-13, 16, 17)</sup>.

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito da presença prolongada de concentrações relativamente baixas de CHX – 0,01 µg/ml (10<sup>-6</sup>%) a 100 µg/ml (0,01%) - no com-

portamento de proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina de culturas de células osteoblásticas obtidas de osso alveolar humano. As concentrações de CHX utilizadas clinicamente são superiores, mas as estruturas biológicas contactam com níveis elevados do anti-séptico durante períodos curtos pois, após aplicação, a concentração de CHX diminui gradualmente ao longo do tempo devido à contínua diluição com a saliva. No entanto, a CHX não tem uma cinética de eliminação linear e mantém-se na cavidade oral por tempo prolongado devido ao facto de possuir substantividade<sup>(28, 32)</sup>. Deste modo, e sobretudo nas situações em que a CHX é utilizada em tratamentos de longa duração, a exposição dos tecidos orais a concentrações baixas deste anti-séptico pode ser significativa. Assim, neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da CHX em células osteoblásticas humanas em condições experimentais diferentes das que têm sido vulgarmente utilizadas, nomeadamente no que diz respeito à concentração e/ou tempo de exposição.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura celular

Para a obtenção da cultura primária, pequenos fragmentos de osso alveolar humano, removidos durante procedimentos cirúrgicos na cavidade oral, foram cultivados em “ $\alpha$ -Minimum Essential Medium” ( $\alpha$ -MEM) enriquecido com 10% de soro bovino fetal, gentamicina (50  $\mu$ g/ml), penicilina-estreptomomicina (100 IU/ml e 100  $\mu$ g/ml, respectivamente) e anfotericina B (2,5  $\mu$ g/ml) à temperatura de 37°C, numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular a partir dos fragmentos ósseos observou-se após cerca de 10-15 dias e as culturas foram mantidas até próximo da confluência. Nesta fase, as células aderentes foram libertadas enzimaticamente (0,04% tripsina e 0,025% colagenase).

O efeito da CHX foi estudado em culturas celulares obtidas a partir da cultura primária – 1ª subcultura. Estas culturas foram mantidas por 28 dias em condições semelhantes às

descritas para a cultura primária, mas na presença de ácido ascórbico (50  $\mu$ g/ml),  $\beta$ -glicero-fosfato de sódio (10 mM) e dexametasona (10 nM). O efeito da CHX (digluconato de clorohexidina, C<sub>22</sub> H<sub>30</sub> C<sub>12</sub> N<sub>10</sub>, SIGMA Chemical Company C-9394 lote 65H0427) foi estudado em duas situações experimentais: (1) exposição das culturas à CHX durante os 28 dias de incubação e (2) exposição das culturas à CHX a partir do 3º dia de cultura e durante o restante período de incubação. Foram utilizadas as seguintes concentrações de CHX: 0,01  $\mu$ g/ml (10<sup>-6</sup> %); 0,1  $\mu$ g/ml (10<sup>-5</sup> %); 1  $\mu$ g/ml (10<sup>-4</sup> %); 10  $\mu$ g/ml (10<sup>-3</sup> %); e, 100  $\mu$ g/ml (0,01%).

As culturas efectuadas em situação controlo (ausência de CHX) e as tratadas com CHX foram caracterizadas ao longo do período de cultura relativamente à proliferação celular (dias 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28), conteúdo em proteína total (dias 7, 14 e 28) e actividade de fosfatase alcalina (dias 7, 14 e 28). Nas culturas expostas à CHX desde o início do período de incubação estudou-se também o efeito do anti-séptico no processo de adesão celular, nomeadamente pela observação da morfologia celular após 30 minutos e 1, 2, 4 e 24 horas. As culturas celulares foram ainda coradas para a identificação histoquímica da presença de fosfatase alcalina (30 minutos, 1, 2, 4 e 24 horas, e 7, 14, 21 e 28 dias).

### Caracterização das culturas celulares

#### Métodos histoquímicos

As culturas, após terem sido fixadas com glutaraldeído a 1,5% durante 10 minutos, foram coradas histoquimicamente para a identificação da presença de fosfatase alcalina; o método baseia-se na hidrólise do naftilfosfato de sódio pela enzima e precipitação do fosfato libertado por reacção com um composto apropriado. A reacção positiva traduz-se pelo aparecimento de uma coloração amarela, castanha ou preta, dependendo da quantidade de enzima.

### Métodos bioquímicos

A proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. Este método baseia-se na redução do sal de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, Sigma, M-5655] pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado ( $\lambda=600$  nm). Os resultados são expressos em A/cm<sup>2</sup>.

A actividade da fosfatase alcalina foi determinada pela hidrólise do p-nitrofenifosfato pela fosfatase alcalina e determinação espectrofotométrica do p-nitrofenol formado ( $\lambda=405$  nm). A actividade da fosfatase alcalina é expressa em nmol de substrato metabolizados por minuto e por mg de proteína (nmol/min/ $\mu$ g proteína).

O conteúdo em proteína total foi determinado pelo método de Lowry, usando a albumina bovina como padrão.

### Análise estatística

Para os ensaios bioquímicos, cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 6 réplicas. Em cada experiência, as diferenças estatísticas observadas entre as culturas expostas à CHX e a cultura controlo foram determinadas pelo método *t*-Student; os valores de  $p = 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

Na figura 1 mostra-se o aspecto de uma cultura primária, obtida por incubação de fragmentos de osso alveolar nas condições descritas na secção anterior. O crescimento celular a partir dos fragmentos ósseos começou a observar-se 10-15 dias após o início da incubação, ocorrendo, seguidamente, um processo exponencial de proliferação. O efeito da CHX foi estudado em células da 1ª subcultura.

### Efeito da CHX no processo de adesão das células ósseas ao substrato de cultura

A suspensão celular obtida após a libertação enzimática das células ósseas da cultura primária foi cultivada na ausência e na pre-

sença de CHX, e a morfologia celular observada durante as primeiras 24 horas de incubação. Apresentam-se os resultados relativos às culturas de 24 horas, figura 2.

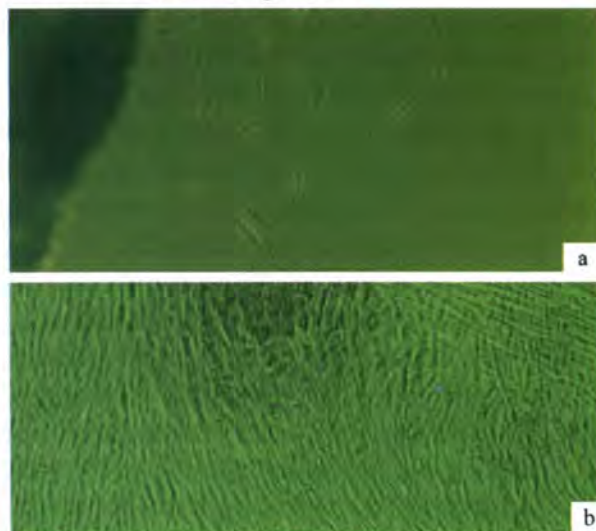


Fig. 1 - Culturas celulares de osso alveolar humano. Microscopia em contraste de fase de uma cultura primária, 40x.

a) Crescimento celular a partir de um fragmento ósseo, 15 dias.

b) Cultura com 28 dias.

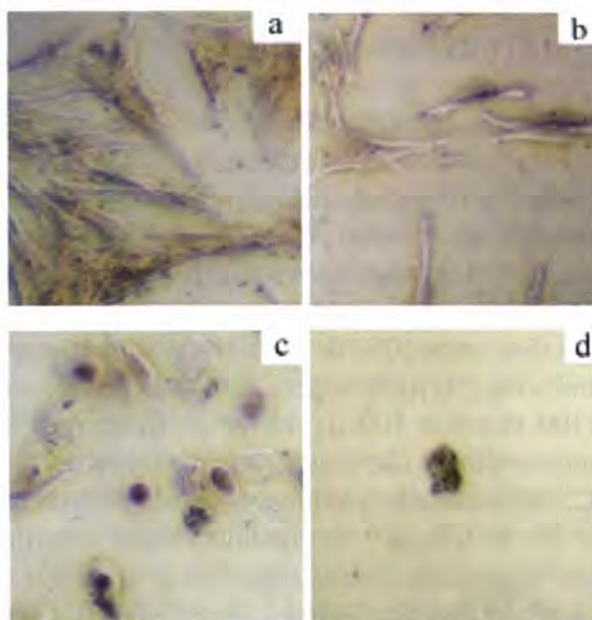


Fig. 2 - Culturas celulares de osso alveolar humano - células da 1ª subcultura cultivadas na ausência (situação controlo) e na presença de clorohexidina por um período de 24 horas. Microscopia óptica de culturas coradas histoquimicamente para identificação da fosfatase alcalina, 100x.

a) Situação controlo; b) Clorohexidina, 0,1  $\mu$ g/ml; c) Clorohexidina, 1  $\mu$ g/ml; d) Clorohexidina, 10  $\mu$ g/ml.

Após a cultura, as células em suspensão entram em contacto com a superfície de cultura e iniciam imediatamente o processo de adesão ao substrato de cultura. Durante as primeiras horas, as células cultivadas em situação controlo sofreram modificações morfológicas profundas (resultados não mostrados) e após aproximadamente 24 horas apresentaram o aspecto morfológico característico das células osteoblásticas. As células expostas a 0,01 e 0,1 µg/ml de CHX mostraram um comportamento semelhante (figura 2, resultados relativos às culturas expostas a 0,1 µg/ml de CHX). As células incubadas na presença de 1µg/ml de CHX apresentaram alterações significativas que se manifestaram por uma perda da morfologia típica com tendência para um arredondamento celular e descolamento da placa de cultura; observaram-se também algumas células esféricas em suspensão. A presença de 10 µg/ml de CHX provocou morte celular no intervalo de algumas horas e nas culturas incubadas com 100 µg/ml a lise celular foi imediata. Nestas duas situações, as culturas com 24 horas mostraram apenas a presença de restos celulares.

**Efeito da CHX na proliferação celular e actividade da fosfatase alcalina**

Nas figuras 3 e 4 apresentam-se, respectivamente, os resultados relativos à proliferação celular e actividade da fosfatase alcalina das culturas celulares efectuadas em situação controlo e na presença de CHX.

Em situação controlo, as culturas celulares apresentaram uma fase estacionária inicial, observando-se seguidamente um aumento da proliferação celular com o tempo de incubação (figura 3). A actividade da fosfatase alcalina aumentou exponencialmente durante a terceira e quarta semanas de cultura (figura 4).

Nas culturas expostas à CHX durante os 28 dias de incubação, verificou-se que a presença de 0,01 e 0,1 µg/ml do anti-séptico resultou num aumento da proliferação celular de cerca de 20-30%. Contudo, na presença de concentrações superiores (1 a 100 µg/ml) não se verificou praticamente crescimento celular (figura

3A). O padrão de variação da fosfatase alcalina com o tempo de incubação foi semelhante ao observado para a proliferação celular (figura 4A).

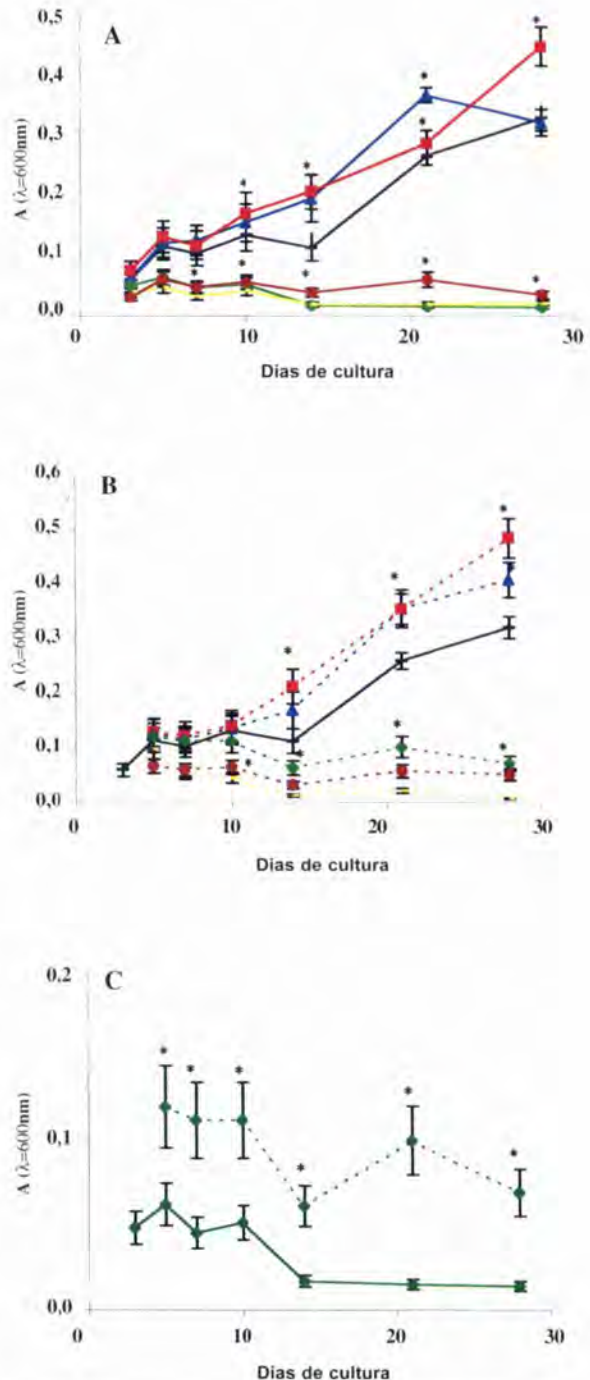


Figura 3 - Proliferação/viabilidade celular de culturas de osso alveolar humano mantidas por 28 dias em condições controlo (-) e na presença de várias concentrações de clorhexidina: 0,01 µg/ml (♦/○), 0,1 µg/ml (▲/△), 1 µg/ml (■/□), 10 µg/ml (●/○) e 100 µg/ml (●/○). A - Culturas expostas à clorhexidina durante os 28 dias de incubação. \*, significativamente diferente das culturas controlo. B - Culturas expostas à clorhexidina a partir do 3º dia de incubação. \*, significativamente diferente das culturas controlo. C - Culturas expostas a 1 µg/ml de clorhexidina. Comparação do comportamento celular nas duas situações experimentais. \*, significativamente diferente das culturas expostas à clorhexidina durante os 28 dias de incubação.

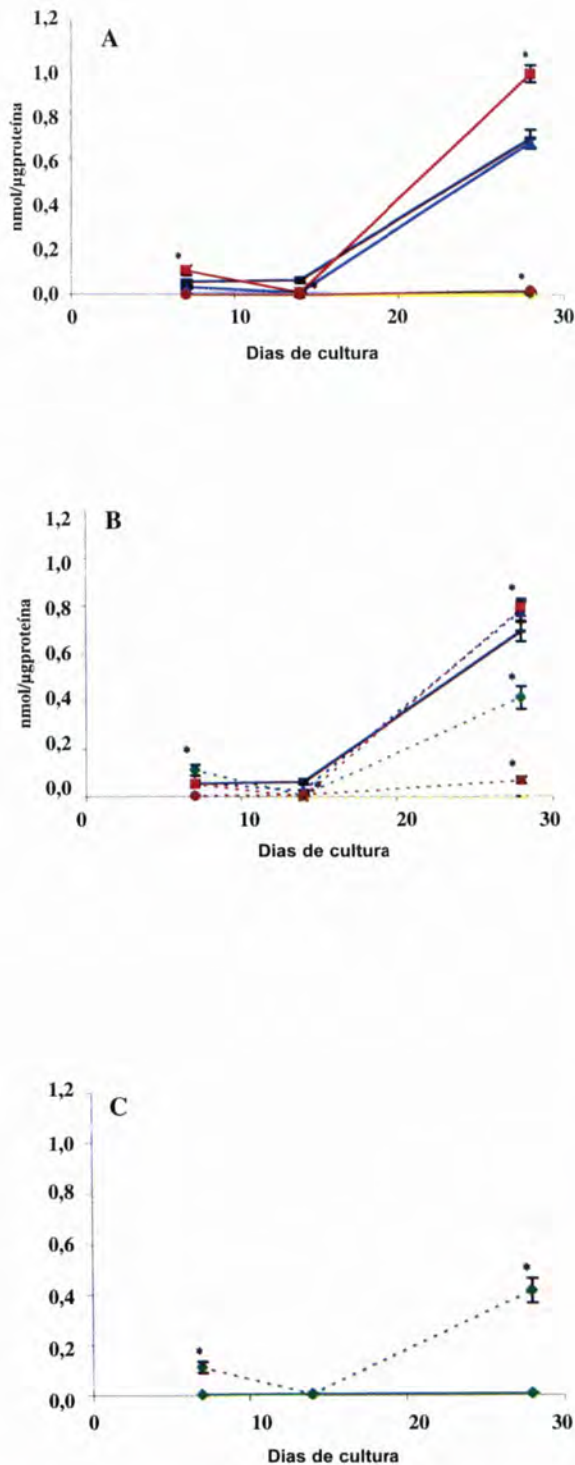


Figura 4 – Actividade da fosfatase alcalina de culturas de osso alveolar humano mantidas por 28 dias em condições controlo (-) e na presença de várias concentrações de clorohexidina: 0,01 μg/ml (♦/◇), 0,1 μg/ml (▲/△), 1 μg/ml (■/□), 10 μg/ml (•/+•) e 100 μg/ml (●/○). A – Culturas expostas à clorohexidina durante os 28 dias de incubação. \*, significativamente diferente das culturas controlo. B – Culturas expostas à clorohexidina a partir do 3º dia de incubação. \*, significativamente diferente das culturas controlo. C – Culturas expostas a 1 mg/ml de clorohexidina. Comparação do comportamento celular nas duas situações experimentais. \*, significativamente diferente das culturas expostas à clorohexidina durante os 28 dias de incubação.

O efeito da CHX foi também avaliado após o processo de adesão celular. Nesta situação, as culturas foram expostas à CHX a partir do 3º dia de incubação. Observou-se também um efeito de estimulação da proliferação celular na presença de 0,01 e 0,1 μg/ml de CHX, que foi acompanhado por uma tendência semelhante na expressão da fosfatase alcalina (figuras 3B e 4B, respectivamente). Nas culturas expostas a 1 μg/ml de CHX verificou-se ainda crescimento celular, cerca de 40 e 20% do observado na situação controlo, respectivamente nos dias 21 e 28 da cultura (figuras 3B e C); adicionalmente, as células em cultura expressaram actividade de fosfatase alcalina (figuras 4B e C). A exposição das culturas a 10 e 100 μg/ml de CHX resultou em morte celular.

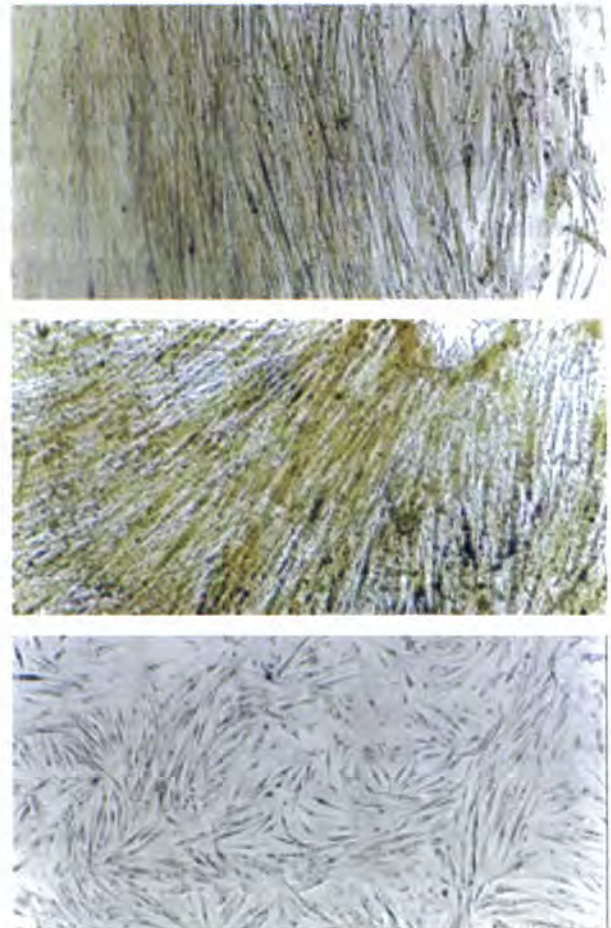


Figura 5 - Caracterização histoquímica de culturas celulares de osso alveolar humano com 28 dias. Células cultivadas em situação controlo (a) e na presença de 0,1 μg/ml (b) e 1 μg/ml (c) de clorohexidina, coradas para a identificação da fosfatase alcalina; 40x. A clorohexidina foi adicionada ao 3º dia de incubação.

Na figura 5 mostra-se o aspecto de culturas celulares com 28 dias efectuadas na situação controlo e na presença de 0,1 e 1 µg/ml de CHX, coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina. Nestas culturas, a CHX esteve presente no meio de incubação a partir do 3º dia. Nas culturas controlo e nas expostas a 0,1 µg/ml de CHX verificou-se crescimento celular abundante com formação de multicamadas que preencheram completamente a placa de cultura e observou-se uma reacção positiva para a fosfatase alcalina. Na presença de 1 µg/ml CHX, o crescimento celular foi significativamente menor, mas as células apresentaram uma reacção positiva para a fosfatase alcalina, traduzida por uma leve coloração amarela.

## DISCUSSÃO

O efeito da CHX foi avaliado em culturas celulares de osso alveolar efectuadas na presença de ácido ascórbico, β-glicerofosfato de sódio e dexametasona, substâncias que favorecem a expressão do fenótipo osteoblástico em vários sistemas de cultura<sup>(35)</sup>. O ácido ascórbico é necessário para a síntese e maturação do colagénio, componente fundamental da matriz extracelular<sup>(18)</sup>; o β-glicerofosfato de sódio é a fonte de fosfato inorgânico, necessário para a mineralização da matriz extracelular<sup>(3, 8)</sup>; a dexametasona induz a proliferação e a diferenciação das células osteoblásticas<sup>(6, 37)</sup>. O efeito da CHX foi estudado em células da 1ª subcultura, pois os resultados de trabalhos anteriores mostraram que nestas culturas se observa uma diminuição progressiva dos parâmetros osteoblásticos com a subcultura sucessiva<sup>(16, 17)</sup>.

As culturas celulares de osso alveolar efectuadas nas condições descritas e em situação controlo proliferaram gradualmente ao longo do tempo de incubação, principalmente nas duas últimas semanas (figura 3). Além disso, sintetizaram níveis elevados de fosfatase alcalina (figura 4), uma enzima produzida pelas células osteoblásticas durante a fase de formação da matriz extracelular. A actividade da fosfatase alcalina foi expressa em relação à

quantidade de proteína total, o que traduz a actividade da enzima a nível celular. Os níveis da fosfatase alcalina atingiram valores elevados no dia 28 e, deste modo, nesta fase da cultura, as células apresentaram maior expressão da enzima que na fase inicial. Esta observação sugere um processo de diferenciação osteoblástica ao longo do tempo de incubação, resultados que estão de acordo com os obtidos previamente para este sistema de cultura<sup>(11, 16, 17)</sup>.

A adesão celular a um substrato desempenha um papel fundamental no crescimento e diferenciação celular<sup>(20)</sup>. Durante este processo, observam-se modificações morfológicas profundas que correspondem a uma reorganização do citoesqueleto celular, estrutura responsável pela forma das células e que influencia de maneira decisiva a proliferação e diferenciação celular<sup>(20)</sup>. As culturas controlo apresentaram um padrão de comportamento semelhante ao descrito previamente para células osteoblásticas obtidas de medula óssea humana e cultivadas em condições experimentais semelhantes<sup>(10)</sup>. O estudo do efeito de um fármaco no processo de adesão celular providencia informação relevante relativamente à sua toxicidade. Os fármacos que interferem com este processo comprometem e/ou impedem a viabilidade celular pois só após a adesão das células ao substrato se observa a sua proliferação e sua diferenciação. A presença de CHX em concentrações iguais e superiores a 1 µg/ml influenciou a adesão celular, efeito que foi dependente da dose (figura 2). Estes resultados estão de acordo com os descritos para outros tipos de células, nomeadamente fibroblastos<sup>(9)</sup> e macrófagos<sup>(31)</sup>, em que se observou que a CHX, a partir de determinada concentração, interfere com o processo de adesão celular.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a exposição prolongada das culturas celulares de osso alveolar humano a concentrações muito baixas de CHX - 0,01 e 0,1 µg/ml - provocou uma estimulação da proliferação celular (cerca de 20 a 30%) que foi acompanhada por um efeito semelhante na actividade da fosfatase alcalina (figuras 3 e 4). O efeito de estimulação do crescimento celular

por concentrações muito baixas de CHX foi anteriormente descrito<sup>(5)</sup>. No estudo referido, os autores mostraram que a CHX, na concentração de 0,1 µg/ml, provocou um aumento da proliferação celular (cerca de 90%) em culturas de fibroblastos orais expostas ao anti-séptico durante três dias<sup>(5)</sup>. A diferença observada no aumento da proliferação celular relativamente às culturas osteoblásticas de osso alveolar pode estar relacionada com o facto dos fibroblastos apresentarem maior taxa de crescimento celular que os osteoblastos. O efeito de estimulação da CHX poderá eventualmente ter implicações clínicas, nomeadamente no que diz respeito à evolução dos processos de cicatrização e reparação dos tecidos orais decorrentes de situações inflamatórias ou pós-operatórias. Devido ao facto da CHX possuir substantividade, é de esperar a exposição prolongada das estruturas orais a concentrações baixas deste anti-séptico.

A CHX exerceu um efeito inibitório na proliferação das células de osso alveolar humano a partir de determinada concentração (entre 0,1 e 1 µg/ml), resultados que estão de acordo com os observados com outros tipos de células, nomeadamente, queratinócitos<sup>(14, 15, 36)</sup>, fibroblastos<sup>(3, 5, 9, 14, 15, 36)</sup>, células ósseas<sup>(4)</sup> e macrófagos<sup>(31)</sup>. Estão descritos valores de CI<sub>50</sub> (concentração inibitória 50) da ordem dos 43 e 21 µg/ml em culturas de fibroblastos<sup>(9, 14, 15)</sup> e 35,9 µg/ml em culturas de queratinócitos<sup>(14, 15)</sup>, expostas à CHX por períodos curtos (minutos a horas).

A citotoxicidade da CHX foi previamente estudada em culturas de osteoblastos obtidos de calvária de rato<sup>(4)</sup>. Neste trabalho, as culturas celulares com 5 dias foram expostas a uma solução a 4% de CHX durante períodos de 2 a 20 minutos e os resultados mostraram uma diminuição significativa e dependente do tempo de exposição do número de células viáveis, parâmetro que foi avaliado após 24 horas (69% em culturas tratadas com CHX durante 2 minutos). Este estudo mostrou ainda que as culturas expostas durante 2 minutos a soluções mais diluídas de CHX (0,04% e 0,4%) apresentaram uma diminuição significativa e dependente da dose no número de célu-

las produtoras de fosfatase alcalina e do número de áreas mineralizadas, parâmetro que foi avaliado 21 dias após o contacto com a CHX. As condições experimentais utilizadas neste trabalho foram muito diferentes das usadas no estudo do efeito da CHX em culturas celulares de osso alveolar humano, nomeadamente no que diz respeito à concentração de CHX, tempo de exposição e fase da cultura em que ocorreu a exposição; deste modo, os resultados não podem ser comparados.

É interessante verificar que se observou uma diferença de comportamento relativamente ao efeito da CHX em culturas celulares de osso alveolar efectuadas nas duas situações experimentais estudadas, isto é, presença do anti-séptico durante todo o período de cultura ou exposição a partir do 3º dia de incubação. Na concentração de 1 µg/ml, a CHX exerceu um efeito citotóxico nas condições experimentais utilizadas, mas observou-se algum crescimento celular nas culturas em que este composto foi adicionado ao meio de cultura após a fase de adesão celular (figuras 3C e 4C). Estes resultados sugerem que os efeitos tóxicos da CHX são menos significativos nas células que já estão aderentes ao substrato.

A CHX exerce o seu efeito antibacteriano por um mecanismo pouco selectivo que envolve uma perturbação da membrana citoplasmática com alteração da sua estrutura e permeabilidade<sup>(25, 28, 32)</sup>. Tem assim uma toxicidade selectiva muito baixa e as concentrações de CHX que são destrutivas para os microrganismos lesam também as células eucarióticas<sup>(1)</sup>. Este efeito citotóxico é dependente da concentração de CHX e do tempo de exposição. No entanto, é de esperar que o efeito citotóxico da CHX seja mais significativo nas células em cultura pois, *in vivo*, as células encontram-se integradas numa estrutura biológica complexa e rodeadas por uma matriz extracelular, o que dificulta o contacto directo da membrana celular com o anti-séptico; além disso, observa-se uma diminuição progressiva da concentração local do fármaco devido a mecanismos farmacocinéticos.



## CONCLUSÃO

Os resultados relativos ao efeito da CHX em culturas osteoblásticas humanas obtidas a partir de osso alveolar mostram que a presença deste anti-séptico tem um efeito directo no comportamento destas culturas. A CHX, em concentrações de 0,01 e 0,1 µg/ml, causa um aumento da proliferação celular e actividade da fosfatase alcalina, mas a presença de concentrações iguais ou superiores a 1 µg/ml provoca um efeito inibitório nestes dois parâmetros celulares que é dependente da dose.

## BIBLIOGRAFIA

1. Audus KL, Tavakoli-Saberi MR, Zheng H Boyce EN. Chlorhexidine Effects on Membrane Lipid Domains of Human Buccal Epithelial Cells. *Journal of Dental Research* 1992; 71(6): 1298-1303.
2. Babich H, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An in vitro Study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biology and Toxicology* 1995; 11: 79-88.
3. Bellows CG, Heersch JNM, Aubin JE. Inorganic phosphate added exogenously or released from b-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone and Mineral* 1992; 17: 15-29.
4. Bhandari M, Adili A, Schemitsch EH. The efficacy of low-pressure lavage with different irrigating solutions to remove adherent bacteria from bone. *J Bone & Joint Surgery* 2001; 83-A: 412-419.
5. Braanchet MCh, Boisnic S, Pascal F, Federlin-Ducani M. Action in vitro d'une solution a base de chlorhexidine a 0,1% sur la prolifération des fibroblastes et la différenciation épithéliale de muqueuse reconstituée. *Journal de parodontologie* 1994; 13: 79-86.
6. Cheng SL, Yang JW, Riffins L. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro. Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrin* 1994; 134: 277-286.
7. Christie P, Claffey N, Renvert S. The use of 0.2% chlorhexidine in the absence of a structured mechanical regimen of oral hygiene following the non-surgical treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 15-23.
8. Chung CH, Golub E.E, Forbes E, Tokuoka T Shapiro IM. Mechanism of action of b-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 1992; 51: 305-311.
9. Cline NV, Layman DL. The Effects of Chlorhexidine on the Attachment and Growth of Cultured Human Periodontal Cells. *J Periodontol* 1992; 63(7): 598-602.
10. Coelho MJ, Fernandes M H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, b-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000; 21:1095-1102.
11. Costa MA, Fernandes MH. Long-term effects of parathyroid hormone, 1,25 dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone on the cell growth and functional activity of human osteogenic alveolar bone cell cultures. *Pharmacological Research* 2000; 42: 345-353.
12. Costa MA, Fernandes MH. Proliferation/differentiation of osteoblastic human alveolar bone cell cultures in the presence of stainless steel corrosion products. *J Mat Sci. Mat Med* 2000; 11: 141-143.
13. Costa MA, Fernandes MH. Mitogenic effect of low concentrations of sodium fluoride on human alveolar bone osteoblastic cell cultures treated with dexamethasone. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15 (Sup 1): Abs. 9P243.
14. Damour O, Zhi Hua S, Lasne F, Villain M, Rousselle P Collombel C. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns* 1992; 18(6): 479-485.
15. Fabreguette A, Zhi Hua S, Lasne F, Damour O. Évaluation de la cytotoxicité des antiseptiques utilisés en pratique courante sue des cultures de fibroblastes et de kératinocytes. *Pathologie Biologie* 1994; 42(9): 888-892.
16. Fernandes MH, Costa MA, Carvalho GS. Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J Mat Sci: Mat Med* 1997; 8: 61-65.
17. Fernandes MH. Long-term behaviour of osteoblast-like human alveolar bone cell cultures. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 1998; 40: 65-75.
18. Franceschi RT. The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr Ver* 1992; 50: 60-65.
19. Gabler WL, Roberts D, Harold W. The effects of chlorhexidine on blood cells. *J Periodont Res*

- 1987; 22: 150-155.
20. Gwynn IAP. Cell biology at interfaces. *J Mat Sci: Mat Med* 1994; 5: 357-360.
  21. Hase J.C., Attstrom R., Edwardsson S., Kelty E., Kisch J. 6-month use of 0.2% delmopinol hydrochloride in comparison with 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo. (I) Effect on plaque formation and gengivites. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 746-753.
  22. Hase JC, Edwardsson S, Rundegren J, Attstrom R, Kelty E. 6-month use of 0.2% delmopinol hydrochloride in comparison with 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo. (II) Effect on plaque and salivary microflora. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 841-849.
  23. Hermes CB, Hilton TJ, Biesbrock AR, Baker RA, Cain-Haimlin J, McClanahan SF. Perioperative use of 0.12% chlorhexidine gluconate for the prevention of alveolar osrteitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 381-7.
  24. Jeffcoat MK, Bray KS, Ciancio SG, Dentino AR, Fine DH, Gordon JM, Gunsolley JC, Killoy WJ, Lowenguth RA, Magnusson NI, Offenbacher S, Palcanis KG, Proskin HM, Fiinkelman RD, Flashner M. Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. *J Periodontol* 1998; 69: 989-997.
  25. Kuyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiology Letters* 100 1992: 211-216.
  26. Leonardo MR, Filho MT, Silva LAB, Filho PN, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endodontics* 1999; 25: 167-171.
  27. Nefussi JR, Casamajor P, Serfaty R, Bolle M, Hugly C, Forest N. Activated adult human alveolar bone cells: a new model of matrix mineralization. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 (suppl 1): 424-428.
  28. Newbrun E. Antiplaque/antigengivitis agents. In: Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ, eds. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, 4th ed. St Louis: Mosby, 1998: 598-607.
  29. Ohle C, Weiger R, Decker E, Schlagenhaut U, Brex M. The efficacy of a single pocket irrigation on subgingival microbial vitality. *Clin Oral Invest* 1998; 2: 84-90.
  30. Owens J, Addy M, Faulkner J, Lockwood C, Adair R. A short-term clinical study design to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinses when used as adjuncts to toothpastes: applied to chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 732-737.
  31. Segura JJ, Jiménez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR. Comparative effects of two endodontic irrigants, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. *J Endodontics* 1999; 25: 243-246.
  32. Seymour RA, Heasman PA. Anti-plaque and anti-calculus agents. In: Seymour RA, Heasman PA, eds. *Drugs, Diseases, and Periodontium*. Oxford: Oxford University Press, 1992: 158-165.
  33. Soete M, Mongardini C, Pauwels M, Haffajee A, Socransky S, Steenberghe D, Quirynen M. One-stage full-mouth disinfection. Long-term microbiological results analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridisation. *J Periodontol* 2001; 72: 374-382.
  34. Stabholz A, Nicholas AA, Zimmerman GJ, Wikesjo UME. Clinical and antimicrobial effects of single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCL or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 794-800.
  35. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnem AJ, Frenkel B, Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilizikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. New York: Academic Press Inc 1996: 69-83.
  36. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin Pharmacol* 1990; 3: 157-163.
  37. Ter Brugge PJ, Jansen DDS. In vitro osteogenic differentiation of rat bone marrow cells subcultured with and without dexamethasone. *Tissue Engineering* 2002; 8: 321-331.
  38. Wilson M, Patel H, Noar JH. Effect of Chlorhexidine on Multi-Species Biofilms. *Current Microbiology* 1998; 36: 13-18.