

Efectos citotóxicos de gluconato de clorhexidina en células epiteliales.

Cytotoxic effect of chlorhexidine gluconate on epithelial cells.

Claudio Cabral-Romero¹, René Hernández-Delgadillo ²

1 Profesor investigador, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Monterrey, Nuevo León, México.

2 Profesor investigador, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Monterrey, Nuevo León, México.

Resumen

La necesidad de nuevos agentes antimicrobianos seguros y eficaces, constituyen una prioridad a nivel mundial como alternativas tanto en la prevención, así como en el tratamiento de enfermedades infecciosas debido al incremento de patógenos multiresistentes. La clorhexidina (CHX) ha sido ampliamente utilizada como agente antiséptico en medicina y odontología, con una excelente efectividad. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la citotoxicidad de la CHX sobre cultivo de la línea celular HeLa. El efecto citotóxico de la CHX fue determinada mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. El daño al ADN genómico de la células fue evaluado por el ensayo del cometa, y finalmente para detectar apoptosis se determinó mediante el ensayo de Anexina V. Nuestros resultados mostraron un 0.72% de células viables, representando una toxicidad severa a 1 minuto de exposición por CHX. El ensayo del cometa fue positivo a CHX, dañando el ADN de células HeLa y mostrando la estela clásica de un cometa al mismo tiempo que el control positivo de daño al ADN (Etopósido, ETO). Finalmente, se detectó que la CHX puede llevar a la destrucción de la célula. En conclusión, la clorhexidina es un excelente antiséptico sin embargo, con la incapacidad de excluir a las células de mamífero lo que puede llegar a la pérdida de las mismas teniendo consecuencias importantes en la curación.

Palabras clave: Clorhexidina (CHX), Citotoxicidad, Genotoxicidad, Apoptosis.

Abstract

The requirement for new safe and effective antimicrobial agents is a priority worldwide as alternatives

both in prevention and in the treatment of infectious diseases due to the increase of multi-resistant pathogens. Chlorhexidine (CHX) has been widely used as an antiseptic agent in medicine and dentistry, with excellent effectiveness.

This work aimed to evaluate the cytotoxicity of CHX on culture of HeLa cell line. The cytotoxic effect of CHX was determined by the MTT cell viability assay. Genomic damage DNA cells was assessed by the comet assay and finally to detect apoptosis was determined by Annexin V assay. Our results showed 0.72% of viable cells, representing a severe toxicity 1 minute CHX exposure. The comet assay was positive to CHX, damaging the DNA of HeLa cells and showing the classic trail of a comet while the positive control DNA damage (Etoposide, ETO). Finally, it was found that the CHX can lead to cell destruction. In conclusion, it is an excellent antiseptic chlorhexidine however, with the failure to exclude mammalian cells which can reach the destruction of these have important implications on healing.

Keywords: Chlorhexidine, Citotoxicity, Genotoxicity, Apoptosis.

INTRODUCCIÓN

La clorhexidina (CHX) es considerada una sustancia antimicrobiana ampliamente utilizada en el área médica y con mayor énfasis en la odontología. Desde 1960 cuando Schroeder reportó propiedades antiplaca de la clorhexidina¹ hasta la actualidad, la clorhexidina ha sido abundantemente reportada en numerosos estudios con la propiedad de “gold standard” en prácticas o experimentos in vitro, utilizada como un control positivo de inhibición de crecimiento microbiano²⁻⁴ y también empleado en estudios o ensayos clínicos⁵⁻⁷. Desafortunadamente, las cualidades perjudiciales de la clorhexidina no son particularmente sobre las bacterias ya que es nociva para células de mamífero incluyendo fibroblastos gingivales⁸, odontoblastos⁹, macrófagos¹⁰. Los colutorios orales en la actualidad contienen ingredientes activos y que en su estructura química tienen la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano e incluso han demostrado eliminar a los biofilms¹¹; sin embargo, existe poca documentación disponible sobre su toxicidad celular y genética¹². El propósito de este estudio fue investigar los efectos nocivos de la clorhexidina en células epiteliales HeLa mediante el ensayo de viabilidad celular MTT, posteriormente analizar el posible daño al ADN genómico empleando el ensayo del cometa y finalmente evaluar si la clorhexidina induce a apoptosis mediante Anexina V.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT en células epiteliales.

Para realizar el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT, que consiste en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que transforma como resultado, de color azul-morado (Formazan), que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.

Primero, cultivamos 1×10^5 células HeLa (ATCC CCL-2) en medio mínimo esencial (MME) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, respectivamente se incubó (SFB, Biowest, Nuaillé, France) a una temperatura de 37°C al 5% de CO_2 utilizando placas de 96 pozos de poliestireno (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) por 24 horas para obtener una monocapa confluyente¹³. Posteriormente, fue retirado el MME y reemplazado con Nuevo MME y agregando a un grupo CHX a una concentración de $1200 \mu\text{M}$ (Ultradent products, South Jordan, UT). Durante el experimento, se evaluaron diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 1440 minutos), y finalmente fue añadido $10 \mu\text{L}$ de MTT (Biotium, Hayward, CA) $14,15$ por pozo por cada $100 \mu\text{L}$ de MME. Después, fue incubado por 2 horas a 37°C and 5% of CO_2 y posteriormente fue retirado el MME y se agregaron $100 \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los productos de Formazán, resultado de la reducción de MTT. El MTT reducido fue cuantificado a una longitud de onda de 570nm utilizando una lectora de placas de ELISA (Biotek, Winooski, VT). La cantidad de Formazán producido es proporcional al número de células vivas. Los experimentos fueron realizados por triplicado y analizados mediante estadística descriptiva.

Evaluación del daño al ADN genómico de la clorhexidina mediante el ensayo del cometa.

Para determinar la posibilidad de daño al ADN de las células después de exponerlas a la CHX, empleamos el ensayo del cometa (Oxiselect, Comet assay, Cell Biolabs, Inc, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero, las células HeLa fueron incubadas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 por 18 horas; un grupo de células fue tratado con clorhexidina a una concentración de $1200 \mu\text{M}$ mientras que el grupo control positivo fue Etopósido (ETO) a una concentración de $100 \mu\text{M}$. Como control negativo, células con MME sin ningún tratamiento. Después de la incubación las células fueron colectadas por centrifugación a 700 RPM por 2 minutos y fue descartado el sobrenadante. A continuación, las células fueron lavadas con BFS (Buffer fosfato salino) y se combinó agarosa de baja fusión en una relación 1:10 y pipeteamos con $75 \mu\text{L}$ /pozo dentro de la laminilla (Oxiselect Comet Slide). La laminilla fue mantenida horizontalmente y se colocó en 25 mL de un amortiguador de lisis y fue incubado por 30 minutos a 4°C en la oscuridad. El amortiguador de lisis fue reemplazado con 25 mL de solución alcalina y fue incubado nuevamente por 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Posteriormente, la laminilla se colocó en una cámara de electroforesis horizontal aplicando una corriente de 30 volts por 30 minutos. Después, la laminilla se lavó con agua estéril y fue reemplazada con etanol frío al 70%

por 5 minutos. El etanol fue removido y la laminilla se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez que la agarosa y la laminilla estaban completamente secos, añadimos 100 µL/pozo del marcador fluorescente (Vista Green Dye, Oxiselect) y se incubó a una temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente, utilizamos un microscopio de fluorescencia para la toma de micrografías usando el filtro FITC (492 nm).

Inducción de apoptosis de la clorhexidina en células epiteliales.

Para analizar si CHX podría conducir a la apoptosis después del periodo de incubación, fueron empleados marcadores específicos (CFTM488A/7-AAD, Apoptosis Assay kit, Biotium, Hayward, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante¹⁶. Las células estuvieron en contacto con CHX durante su crecimiento a 1200 µM. Como control positivo de apoptosis, ETO a 100 µM y finalmente células sin tratamiento. Después de 24 horas, las células fueron removidas y lavadas con solución de fosfato salino (PBS). Consecutivamente, las células fueron resuspendidas en solución de unión al 1X y se hicieron alícuotas de 100 µL por tubo. Después, fueron agregadas las soluciones de trabajo (5 µl de CF488A-Annexin V y 2 µl de 7-AAD) a las células y se incubaron por 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se evaluaron los resultados utilizando microscopía de fluorescencia (Olympus IX70, Miami, EUA).

RESULTADOS

Evaluación de la citotoxicidad de la CHX en células epiteliales

Para determinar la citotoxicidad, fue expuesta la CHX a diferentes tiempos utilizando una sola concentración (1200 µM equivalente a 0.12%) que es la más utilizada en colutorios orales. El número de células vivas fue determinado mediante el ensayo de viabilidad celular MTT y los resultados indicaron que el 99.28% de las células no sobrevivieron a las exposiciones de la clorhexidina a los 5, 10, 15, 30 y 1440 minutos, impidiendo completamente su crecimiento y división celular, exhibiendo su alto efecto citotóxico sobre nuestros experimentos con células epiteliales HeLa (Figura 1).

Efecto de la CHX en el ADN genómico sobre células epiteliales.

El posible daño al ADN genómico por la CHX fue determinado mediante el ensayo del cometa mediante microscopía de fluorescencia. Se pudo observar que después de la incubación con CHX y ETO, ambos,

presentaron la estela clásica de un cometa, indicando su ADN dañado en comparación con células sin ningún tratamiento lo que sugiere la ausencia de efectos tóxicos sobre el ADN en nuestras condiciones experimentales. Basándose en estos resultados, la CHX a una concentración de 1200 μM por 24 horas, tiene un daño importante, afectando el ADN de células HeLa (Figura 2).

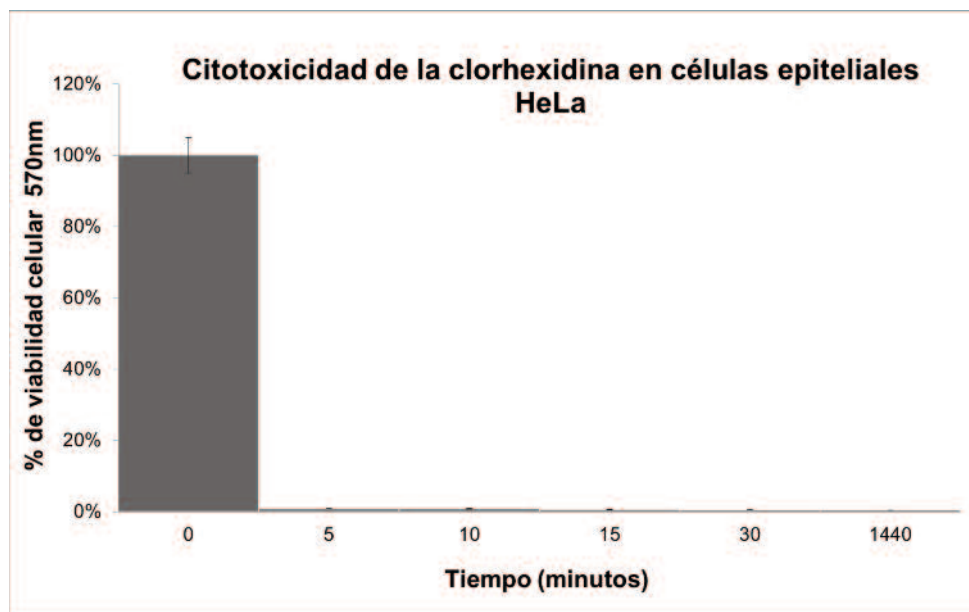


Figura 1. Ensayo de viabilidad celular MTT de la CHX sobre células epiteliales HeLa a diferentes tiempos de exposición.

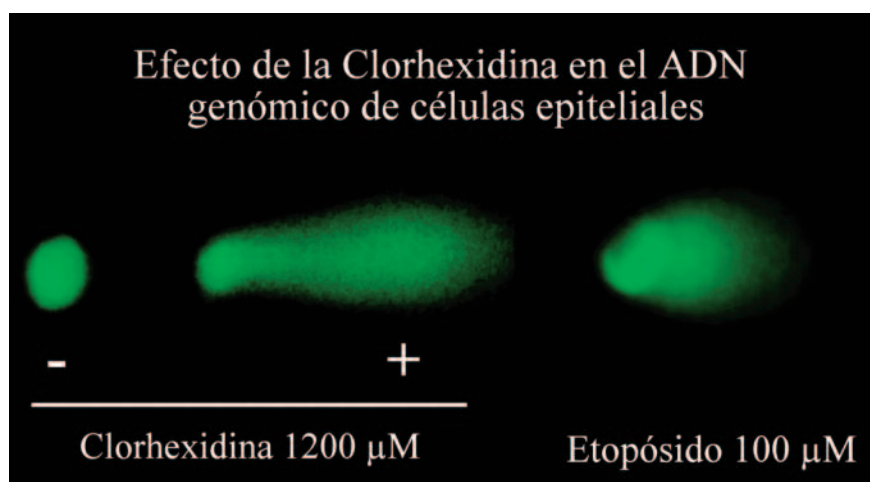


Figura 2. Determinación de genotoxicidad de la CHX mediante el ensayo del Cometa.

Detección de apoptosis en el crecimiento de células HeLa con la CHX mediante microscopía de fluorescencia.

Para corroborar si la CHX podría inducir a la apoptosis de las células, se empleó el ensayo de Anexina V mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados indicaron que la CHX en la concentración de 1200 μ M promueve la apoptosis de las células HeLa (Figura 3). El conjugado fluorescente de Anexina V interactúa con fosfatidilserina expuesta por las células y lo observamos claramente por microscopía de fluorescencia (Figura 3). No obstante, el marcador utilizado 7-AAD (7-aminoactinomicina D) que tiene una gran afinidad por el ADN especialmente en regiones ricas en GC. En la Figura 3 podemos ver que este marcador, en células dañadas puede atravesar la membrana citoplasmática, de lo contrario ocurre lo opuesto, observamos un claro estado necrótico en ambos casos (CHX y ETO).

Estos resultados sugieren que la concentración de CHX y ETO, inhiben el crecimiento de las células HeLa mediante la alteración de las funciones básicas y promoción de apoptosis.

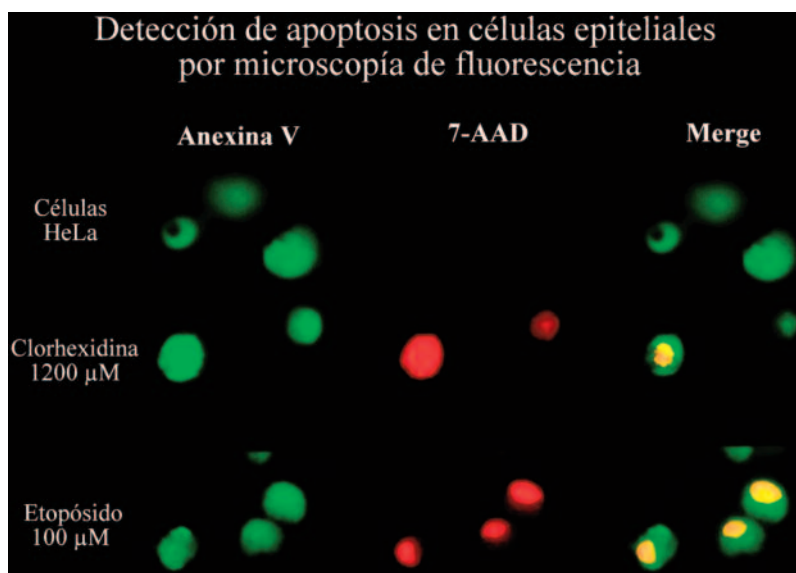


Figura 3. Análisis de la detección de apoptosis inducida por CHX en células epiteliales HeLa mediante anexina V.

DISCUSIÓN

Una de las características que posee la CHX es su gran potencial no selectivo antimicrobiano de la microbiota oral; sin embargo llega a afectar a las células mamíferas⁸. De hecho, a muy bajas concentra

ciones es tóxico en una variedad importante de células eucariotas^{9,17} y también al sistema inmune^{10,18}. En nuestro trabajo encontramos que la CHX al 0.12%, dañó completamente la monocapa de células HeLa a los 5 minutos de exposición basado en el ensayo de viabilidad celular MTT, resultado similar a lo encontrado en el ensayo con células odontoblasticas (MDPC-23)⁹. Existen numerosos informes sobre su seguridad como un enjuague oral, pero sus efectos sobre la curación de heridas han sido contradictorios. En un estudio in vitro con fibroblastos humanos, las células que se expusieron a la CHX al 0.12% durante 30 segundos, apoyan la hipótesis de que la CHX es altamente citotóxico para las células in vitro y debido esto, diversas funciones celulares tales como la proliferación y la síntesis de proteínas se ven afectados en diferentes grados por la droga¹⁹. Los efectos de la CHX fueron evaluados por Chang y colaboradores sobre células humanas de ligamento periodontal (PDL) inhibiendo la síntesis de proteínas²⁰. El mecanismo intrínseco citotóxico de la CHX sobre células eucariotas es, sin embargo, todavía desconocido. Se ha propuesto que la CHX inhibe la actividad mitocondrial; síntesis proteínas y ADN, así como afectando la proliferación celular, finalmente causando la muerte celular por el agotamiento de ATP²⁰⁻²². Nuestros resultados demostraron que la CHX al 0.12% posee una toxicidad severa incluso, en el menor tiempo de exposición (1 minuto) lo que nos lleva a buscar nuevas alternativas de tratamiento, que sean seguras y sin ningún efecto nocivo a los tejidos orales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Schroeder, H. E. Formation and inhibition of dental calculus. *Journal of periodontology* 40, 643-646, doi:10.1902/jop.1969.40.11.643 (1969).
- 2 Hernandez-Delgadillo, R. et al. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *International journal of nanomedicine* 7, 2109-2113, doi:10.2147/IJN.S29854 (2012).
- 3 Hernandez-Delgadillo, R. et al. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *International journal of nanomedicine* 8, 1645-1652, doi:10.2147/IJN.S38708 (2013).
- 4 Bottcher, D. E., Sehnem, N. T., Montagner, F., Fatturi Parolo, C. C. & Grecca, F. S. Evaluation of the Effect of *Enterococcus faecalis* Biofilm on the 2% Chlorhexidine Substantivity: An In Vitro Study. *Journal of endodontics* 41, 1364-1370, doi:10.1016/j.joen.2015.04.016 (2015).
- 5 Yousefimanesh, H., Amin, M., Robati, M., Goodarzi, H. & Otoufi, M. Comparison of the Antibacterial Properties of Three Mouthwashes Containing Chlorhexidine Against Oral Microbial Plaques: An in vitro Study. *Jundishapur journal of microbiology* 8, e17341, doi:10.5812/jjm.17341 (2015).

- 6 Dehghani, M., Abtahi, M., Sadeghian, H., Shafaei, H. & Tanbakuchi, B. Combined chlorhexidine-sodium fluoride mouthrinse for orthodontic patients: Clinical and microbiological study. *Journal of clinical and experimental dentistry* 7, e569-575, doi:10.4317/jced.51979 (2015).
- 7 Fomete, B., Saheeb, B. D. & Obiadazie, A. C. A prospective clinical evaluation of the effects of chlorhexidine, warm saline mouth washes and microbial growth on intraoral sutures. *Journal of maxillofacial and oral surgery* 14, 448-453, doi:10.1007/s12663-014-0666-0 (2015).
- 8 Mariotti, A. J. & Rumpf, D. A. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *Journal of periodontology* 70, 1443-1448, doi:10.1902/jop.1999.70.12.1443 (1999).
- 9 Lessa, F. C. et al. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *Journal of applied oral science: revista FOB* 18, 50-58 (2010).
- 10 Bonacorsi, C., Raddi, M. S. G. & Carlos, I. Z. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 207-212 (2004).
- 11 Fu, J. et al. In vitro antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouth washes. *Oral diseases* 20, 815-820, doi:10.1111/odi.12242 (2014).
- 12 Saad, S., Greenman, J. & Shaw, H. Comparative effects of various commercially available mouthrinse formulations on oral malodour. *Oral diseases* 17, 180-186, doi:10.1111/j.1601-0825.2010.01714.x (2011).
- 13 Youngner, J. S. Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 85, 202-205 (1954).
- 14 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63 (1983).
- 15 Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. & Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry* 69, 581-593 (1997).
- 16 Zelenin, A. V. et al. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry* 5, 348-354, doi:10.1002/cyto.990050410 (1984).
- 17 Kolahi, J., Ghalayani, P. & Varshosaz, J. Systemic toxicity following ingestion of the chlorhexidine gluconate solution: a case report. *Journal of the International Academy of Periodontology* 8, 45-46 (2006).
- 18 Li, Y.-C., Kuan, Y.-H., Lee, S.-S., Huang, F.-M. & Chang, Y.-C. Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro. *Environmental Toxicology* 29, 452-458, doi:10.1002/tox.21771 (2014).
- 19 Pucher, J. J. & Daniel, C. The Effects of Chlorhexidine Digluconate on Human Fibroblasts In Vitro. *Journal of periodontology* 63, 526-532, doi:10.1902/jop.1992.63.6.526 (1992).

-
- 20 Chang, Y. C., Huang, F. M., Tai, K. W. & Chou, M. Y. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 92, 446-450, doi:10.1067/moe.2001.116812 (2001).
 - 21 Faria, G. et al. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. Journal of endodontics 33, 715-722, doi:10.1016/j.joen.2006.12.023 (2007).
 - 22 Faria, G., Cardoso, C. R., Larson, R. E., Silva, J. S. & Rossi, M. A. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. Toxicology and applied pharmacology 234, 256-265, doi:10.1016/j.taap.2008.10.012 (2009).

Autor de correspondencia:
René Hernández Delgadillo
rene.hdz.d@gmail.com

Artículo recibido: 2 de Febrero de 2016.

Artículo aprobado para publicación: 26 de Abril de 2016.