



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

TEMA:

**"CITOTOXICIDAD DEL DIGLUCONATO DE
CLORHEXIDINA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS: REVISIÓN
SISTEMÁTICA."**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:
ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA ORAL
Y MAXILOFACIAL**

**P R E S E N T A:
OMAR EVERARDO JIMÉNEZ TEJEDA**

**TUTOR:
DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS**


Vo. Bo. Dr. René García Contreras



**ASESORES:
CMF. GABRIELA VILAR PINEDA
CMF. RICHAEAL ANTONIO SILVA SUÁREZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

TEMA:

**"CITOTOXICIDAD DEL DIGLUCONATO DE
CLORHEXIDINA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS: REVISIÓN
SISTEMÁTICA."**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:
ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA ORAL
Y MAXILOFACIAL**

**P R E S E N T A:
OMAR EVERARDO JIMÉNEZ TEJEDA**

**TUTOR:
DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS**

**ASESORES:
CMF. GABRIELA VILAR PINEDA
CMF. RICHAEEL ANTONIO SILVA SUÁREZ**



Dedicatorias

A mis padres y hermana:

Les dedico todo, porque este es un logro de ustedes y para ustedes también, porque sin ustedes a mi lado nada de esto habría sido posible.

A mis amigos y mis seres queridos y compañeros de residencia:

Por estar de una u otra forma a lado mío durante este camino, a quienes brindaron palabras de aliento, comprensión y apoyo incondicional.

Agradecimientos

Universidad Nacional Autónoma de México:

Por permitirme formar parte de esta gran institución, por darme la oportunidad de demostrar que con empeño, con perseverancia y disciplina es posible cumplir metas.

A mis maestros:

Doctores, gracias por confiar en mí, por apoyarme, guiarme y ser un ejemplo en cada acción durante este proceso. Gracias por aportar de su experiencia y sus conocimientos durante mi formación.

A mi tutor y asesores:

Gracias por el apoyo y hacerme parte de este equipo de investigación que hoy me da la oportunidad de culminar de la mejor manera mi posgrado.

Citotoxicidad del digluconato de clorhexidina en cultivos primarios de osteoblastos humanos: Revisión sistemática.

Resumen

El control de los microorganismos orales posee una gran importancia para la recuperación y la conservación de la salud bucal. La clorhexidina es un agente antimicrobiano de amplio espectro y persistencia prolongada generalmente utilizado como antiséptico local en la práctica clínica diaria, lo que la convierte, en el antiséptico oral por excelencia. A pesar de las numerosas propiedades positivas de la clorhexidina, múltiples estudios han señalado que esta posee efectos citotóxicos en células tanto eucariotas como procariotas. **Objetivo:** Conocer el estado del arte mediante una revisión sistemática las evidencias disponibles acerca de cuáles son los efectos citotóxicos asociados al uso de clorhexidina sobre cultivos de osteoblastos humanos. **Materiales y Métodos:** Se llevó a cabo una revisión sistemática durante el mes de Marzo del 2021, sobre artículos publicados en los últimos 10 años en 3 bases de datos electrónicas (*PubMed, ScienceDirect, Google Scholar*) obteniendo un total de 587 artículos de manera inicial. Al final de esta búsqueda 16 artículos cumplieron con los criterios para la inclusión y revisión a detalle. **Conclusión:** La clorhexidina a pesar de ser considerado como uno de los antisépticos más accesibles y de mayor popularidad, ha demostrado presentar alteraciones estructurales, alteraciones bioquímicas y de respuesta sobre los osteoblastos humanos a diferentes diluciones, disminuyendo la viabilidad celular de manera significativa.

Palabras clave: *Clorhexidina, osteoblastos, citotoxicidad, viabilidad celular.*

Abstract

The control of oral microorganisms is of great importance for the recovery and preservation of oral health; Chlorhexidine is a broad-spectrum antimicrobial agent and prolonged persistence, generally used as a local antiseptic in daily clinical practice, which makes it, the oral antiseptic par excellence. Despite the many positive properties of chlorhexidine, multiple studies have indicated that it has cytotoxic effects in both eukaryotic and prokaryotic cells. **Objective:** To know the state of art through a systematic review about the cytotoxic effects of the use of chlorhexidine on human osteoblasts culture. **Materials and Methods:** A systematic review was carried out during the month of March 2021, searching articles published in the last 10 years in 3 electronic databases (PubMed, Science Direct, Google Scholar) obtaining a total of 587. At the end of this review, 16 articles met the criteria for inclusion and detailed review. **Conclusion:** Chlorhexidine despite being considered one of the most accessible and popular antiseptics, has been shown to present structural alterations, biochemical alterations and response on human osteoblasts at different dilutions, decreasing cell viability significantly.

Key words: *Chlorhexidine, osteoblasts, cytotoxicity, cell viability.*

Índice General

Dedicatorias	1
Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	4
Índice General	5
Índice de tablas / cuadros	6
Justificación	7
Introducción	8
Metodología	11
Discusión	21
Conclusión	26
Bibliografía	27

Índice de Figuras y Tablas

Diagrama de flujo PRISMA	14
Cuadro Comparativo de Estudios Incluidos en la Revisión	15

Justificación

El presente trabajo de investigación se basa principalmente en la necesidad de conocer el estado del arte del uso de la clorhexidina como agente antiséptico en procedimientos en la región bucal y el efecto que esta sustancia tiene sobre osteoblastos humanos.

Son bien conocidas las propiedades y beneficios que se obtienen con el uso de clorhexidina de grado reactivo en procedimientos dentro de la región bucal, sin embargo, es importante conocer si más allá de dichos beneficios, existen alteraciones especialmente sobre los osteoblastos humanos que disminuyan la viabilidad celular, la capacidad de dichas células para cumplir sus funciones biológicas y sobre todo establecer cuáles son los mecanismos que generan estas alteraciones a nivel estructural y molecular.

La razón de realizar esta revisión sistemática está basada entonces en poder establecer si existen factores que puedan alterar la función celular de los osteoblastos humanos en procesos tales como la regeneración ósea, la oseointegración de materiales implantados sobre hueso mandibular o maxilar, o la misma generación de proceso regenerativos en tejidos faciales.

Este trabajo de investigación se centra en una revisión sistemática de todos los estudios en los cuales se sometieron osteoblastos humanos a la exposición de digluconato de clorhexidina en diferentes concentraciones para poder así determinar si existen factores que generen algún cambio sobre este linaje celular; además, poder establecer cuáles son los mecanismos que generan estos cambios, señalando con exactitud y enlistando los resultados y conclusiones obtenidas en cada uno de los estudios sometidos a esta revisión.

Introducción

El control de los microorganismos orales posee una gran importancia para la recuperación y la conservación de la salud bucal, debido a que éstos desempeñan un papel clave en la aparición de las periodontopatías. Además de la eliminación mecánica de los depósitos bacterianos del periodonto a través del cepillado, también es posible inhibir significativamente la proliferación de gérmenes orales mediante tratamientos químicos adecuados. ¹ La clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40's por el *Imperial Chemical Industries* en Inglaterra por científicos en un estudio contra la malaria. Sin embargo, en odontología se utilizó inicialmente para desinfección de la boca y endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue el realizado por Løe y Schiott en 1970, donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2% en ausencia de cepillado normal, inhibe la formación de placa y consecuentemente el desarrollo de gingivitis. ²

La clorhexidina es una molécula sintética que está químicamente compuesta por dos anillos de 4-clorofenil y dos grupos biguanida conectados entre sí por un puente de hexametileno; funcionalmente, la clorhexidina es un agente antimicrobiano de amplio espectro de carácter inespecífico, baja toxicidad sistémica y persistencia prolongada generalmente utilizado como antiséptico local en la práctica clínica diaria, lo que la convierte, en sus diferentes formas de presentación, en el antiséptico oral por excelencia. ^{1, 3}

Cuando esta sustancia cumple su función con ciertas características específicas, entre las cuales puede mencionarse un pH ideal de entre 5.5- 7.0, existe un máximo beneficio para poseer un amplio espectro en contra de microorganismos orales, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, esporas bacterianas, virus lipofílicos, y dermatofitos.

Se sabe además que la clorhexidina posee numerosas propiedades positivas las cuales no interfieren con los distintos procedimientos llevados a cabo dentro de estructuras adyacentes. Dicha acción antimicrobiana y otras propiedades benéficas de la clorhexidina han sido sujetas a investigación en diferentes áreas biomédicas, sin tener aún claro el mecanismo de acción de dicha sustancia o cuales son los efectos que puede tener sobre células humanas. ⁴

Se comercializa como gluconato y digluconato de clorhexidina, con distintas formas de presentación como: solución acuosa, solución alcohólica, con detergentes catiónicos, así como en gel bioadhesivo, en pasta dentífrica, en aerosol y en forma de barniz. Algunas de estas formas pueden ser utilizadas para uso cutáneo durante el lavado de manos, para la preparación de campo quirúrgico, para el tratamiento de heridas y quemaduras y para uso bucal en lesiones atróficas y erosivas de la mucosa oral, se puede utilizar en tejidos duros, úlceras traumáticas, mucositis asociada a quimio y radioterapia, posterior a colocación de injertos óseos, en cirugía preprotésica e implantología, y tener responsabilidad en la inhibición farmacológica durante formación de la placa dental y periodontal supragingival.⁵

La clorhexidina absorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo; los estudios parecen indicar que la acción inhibitoria es únicamente debida a la clorhexidina unida a la superficie de los dientes, generando así que los efectos de la clorhexidina a la superficie dental y a la mucosa oral persistan hasta 48 horas después de su aplicación. Se utiliza como colutorio en solución acuosa al 0.2%, aunque también es eficaz, y quizá preferible, al 0.12%, logrando disminuciones del 90% en el contenido bacteriano de la saliva. ^{2,6}

A pesar de las numerosas propiedades positivas de la clorhexidina, múltiples estudios han señalado que esta posee efectos citotóxicos en células tanto eucariotas como procariotas, señalando mecanismo como la diseminación de la síntesis proteica, interferencia en la respiración mitocondrial, inhibición de la síntesis de ADN así como la proliferación celular misma.⁷

Diversos estudios han indicado que la clorhexidina presenta efectos citotóxicos en cultivos de diferentes líneas celulares como son: fibroblastos de rata, fibroblastos dérmicos humanos, fibroblastos gingivales humanos, células del ligamento periodontal en humanos, células óseas alveolares en humanos) y líneas celulares de osteoblastos humanos. Sin embargo, las posibles consecuencias toxicológicas no se han dilucidado con exactitud.^{6, 7, 8,15}

Sin embargo un estudio más, señaló que la clorhexidina es capaz de mantener niveles elevados de proteínas en distintas superficies así como estar asociada a mayor viabilidad celular y mostrar además, niveles significativamente más altos de factores de crecimiento en comparación con otras sustancias utilizadas con el mismo fin.⁹

Basado en dicha información, este artículo tiene como objetivo conocer el estado del arte mediante una revisión sistemática las evidencias disponibles acerca de cuáles son los efectos citotóxicos asociados al uso de clorhexidina de grado reactivo sobre cultivos de osteoblastos humanos, tratando así de comprobar si existe una relación entre el uso de esta sustancia y la viabilidad de dicho linaje celular.

Metodología

Pregunta de Investigación

En cultivo primario de osteoblastos humanos, ¿La exposición a digluconato de clorhexidina al 0.12% en comparación con dosis mayores al 0.12%, disminuye la viabilidad celular?

Materiales y Métodos

En este trabajo de investigación, se realizó una revisión sistemática basada en la búsqueda de artículos publicados en bases de datos de manera electrónica, basando el desarrollo del presente trabajo en las directrices de grupo PRISMA ^{10,11} para la correcta elaboración de una revisión sistemática, detallando de la siguiente manera el proceso de desarrollo: Se llevó a cabo una búsqueda inicial en 3 bases de datos de manera electrónica: *PubMed*, *Science Direct*, y *Google Scholar* durante los meses de Marzo del 2021, dentro de esta búsqueda inicial se utilizaron términos como “*Chlorexidine*”, “*Cytotoxicity*”, “*Osteoblasts*”, “*Cell Viability*”, mostrando una visión global de la cantidad de información relacionada a las palabras clave utilizadas y partir de ahí se realizó una búsqueda sistemática y se filtraron los resultados más adecuados para la inclusión de esta revisión.

La segunda fase de la búsqueda (búsqueda sistemática), se llevó a cabo en Marzo del 2021, dentro de las bases de datos *PubMed*, *ScienceDirect*, *Google Scholar*, mediante el uso de términos MeSH ya mencionadas (“*Chlorexidine*”, “*Cytotoxicity*”, “*Osteoblasts*”, “*Cell Viability*”) además de buscadores booleanos como: AND, OR. Siendo las combinaciones (*Chloerhexidine AND Osteoblasts*), (*Chlorhexidine AND Cytotoxicity*), (*Chlorhexidine AND toxic AND Osteoblasts*), (*Chlorhexidine AND Cell viability*). Teniendo como resultado concreto 149 artículos en *PubMed*, 438 en *Science Direct*.

Se establecieron criterios de inclusión para la selección de los artículos e información integrada a esta revisión, siendo los siguientes los aspectos tomados en cuenta:

- Por publicación
 - Textos completos.
 - Publicados en los últimos 10 años (2011-2021).

- Por tema:
 - Limitados al estudio de Citotoxicidad de la Clorhexidina.
 - Estudio en osteoblastos humanos.
 - Uso de Clorhexidina de grado reactivo.

- Por idioma:
 - Artículos publicados en idioma Inglés y Español.

Los criterios de exclusión para la búsqueda científica estuvieron dados por los siguientes:

- Por publicación:
 - Artículos que tuvieran más de 5 años de antigüedad en las bases de datos.

- Por tema:
 - Estudios realizados sobre células distintas al objetivo de nuestra revisión.
 - Uso de otras sustancias en conjunto a la clorhexidina.

Los criterios de eliminación estuvieron limitados a aquellos artículos que se encontraran duplicados en las bases de datos utilizadas.

De acuerdo a estos artículos y según filtrar los artículos con el nombre del título se consideraron adecuados para la revisión sistemática a 67 artículos, tras eliminar a 4 artículos debido a su duplicidad en las bases de datos; se procedió a la lectura de los resúmenes de todos los artículos y se descartaron 55 artículos. Al final de esta búsqueda sistemática, se incluyeron 12 artículos para la revisión a detalle, todos ellos, relacionando la citotoxicidad de la clorhexidina sobre células de tipo osteoblastos. (Figura 1).

Para enriquecer la información obtenida, se realizó una búsqueda manual, la cual fue llevada a cabo obteniendo 10 de los artículos referenciados en los artículos previamente incluidos a esta revisión sistemática, dicha búsqueda fue realizada en la base de datos de *Google Scholar*, de los cuales 4 cumplían con los criterios establecidos para su inclusión.

A manera de resumen en la *tabla 1*, se enlista cada uno de los estudios incluidos en esta revisión sistemática; señalando cuales fueron los linajes celulares que fueron sometidos a estudios, las sustancias utilizadas para evaluar la viabilidad celular así como las especificaciones de las mismas, las dosis, y toda la metodología utilizada para cada uno de los estudios, en la última columna de la tabla, se señalan los resultados obtenidos, mismos resultados que van desde análisis morfológicos celulares, cambios en las propiedades bioquímicas de las sustancias puestas a prueba, estímulos sobre sustancias específicas, así como aquellos resultados que muestran datos estadísticos.

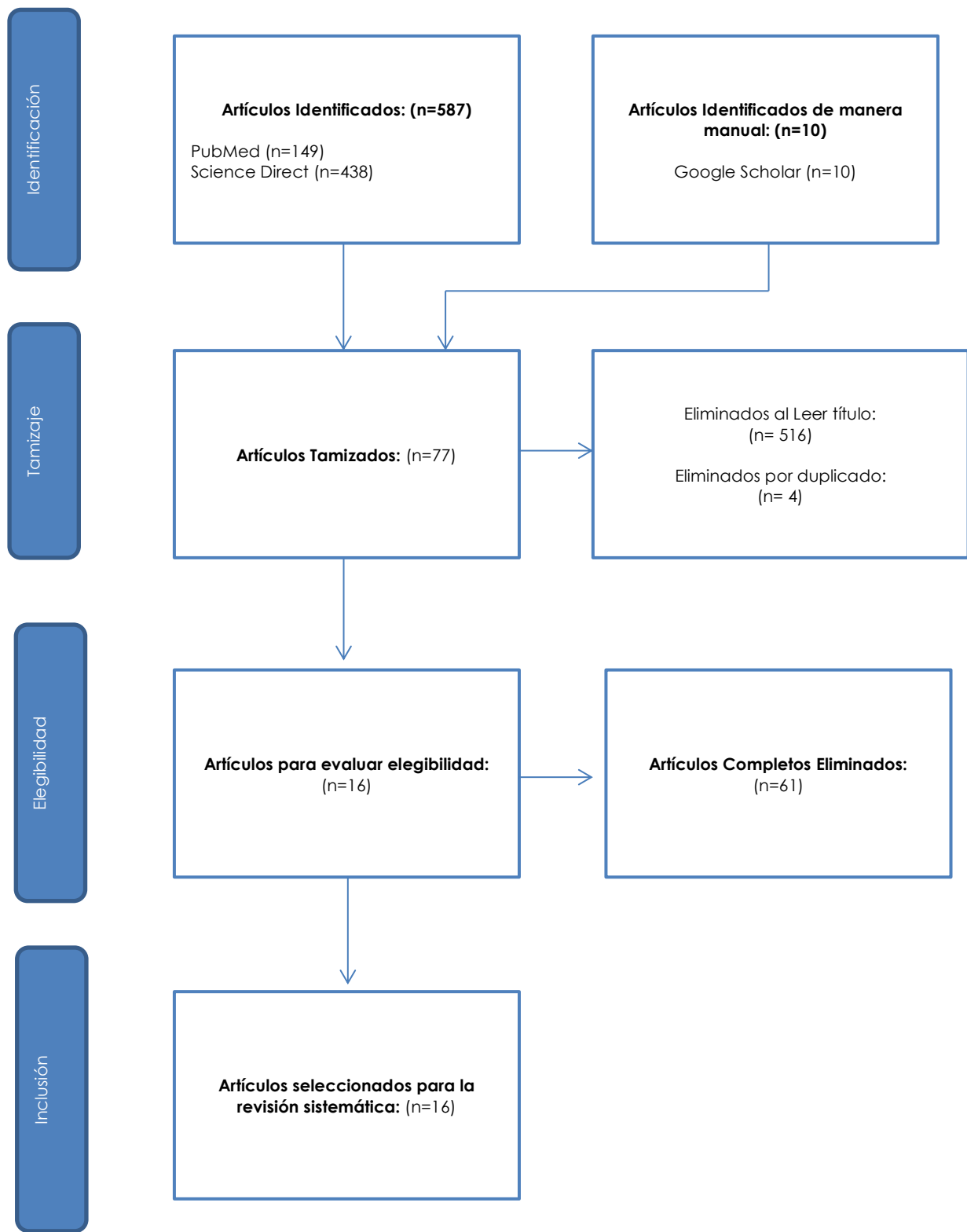


FIG.1 Diagrama de flujo PRISMA para revisión sistemática

Tabla I. Cuadro comparativo de los estudios de citotoxicidad de la clorhexidina sobre osteoblastos humanos.

Autores	Línea Celular estudiada	Sustancia analizada	Metodología	Resultados
<i>Markel et al.</i> ²⁸	Osteoblastos humanos	<ul style="list-style-type: none"> - Solución salina 0.9% - Bacitracin 33UI/ml - Clorpactin 2g - IriSept 0.05% 	<ul style="list-style-type: none"> -Exposición celular a 1, 2, 4 minutos. - Análisis de viabilidad celular (Colorimetría, AlarmBLue). 	<ul style="list-style-type: none"> - Cambios estructurales celulares a partir de 24 hrs. - IriSept 0.05% cambios irreversibles.
<i>Abdul et al.</i> ²⁹	Superficies quirúrgicas de 3ros Molares.	<ul style="list-style-type: none"> - Gelfoam de Clorhexidina 	<ul style="list-style-type: none"> Análisis salival 1 semana preqx. -Análisis salival 1 semana postqx. -Prueba ELISA. -Análisis de IL-6 & TNF-α. 	<ul style="list-style-type: none"> - Asociado a menor tiempo de recuperación. - ↓ IL-6. - ↓ TNF-α.

<p><i>Böhle et al.</i>³⁰</p>	<p>Osteoblastos Humanos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Lavanox 0.08% - Irrisept 0.05% 	<ul style="list-style-type: none"> -Exposición celular. -Análisis de DHL. -Espectrofotometría. -Microscopía de Fluorescencia. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Efecto citotóxico en ambas soluciones.
<p><i>Song et al.</i>³¹</p>	<p>Pre osteoblastos de ratón (MC3T3-E1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 0.12% - Listerine® Citrus - Listerine® Zero - Garglin® - Garglin® Child 	<ul style="list-style-type: none"> -Conteo celular. -ANOVA. -Viabilidad Celular cuantitativa (Kit 8). 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Viabilidad celular. - Altera la morfología celular. - Sin diferencia significativa entre soluciones.
<p><i>Liu et al.</i>³²</p>	<p>Fibroblastos , mioblastos, osteoblastos humanos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 0%, 0.002%, 0.2%, 2% 	<ul style="list-style-type: none"> -Exposición y migración celular. -Evaluación de citotoxicidad con kit 8. -Valor P. 	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 2% ↓ la migración celular de manera permanente. - P <0.01

<i>Ugur et al.</i> ³³	Osteoblastos Humanos	<ul style="list-style-type: none"> - EDTA - Clorhexidina - QMIX 	<ul style="list-style-type: none"> -Exposición celular 2, 3,6 hrs. -Viabilidad celular (MTT) -Evaluación estadística 	<ul style="list-style-type: none"> - P <0.01 a exposición mayor a 4 horas.
<i>Terry et al.</i> ³⁴	Osteoblastos MDCP-23	<ul style="list-style-type: none"> - Diacetato de clorhexidina - GalatoEpiCtequina (EGCG) 	<ul style="list-style-type: none"> -Exposición celular -viabilidad celular (MTT) 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ IL-7 - No efecto sobre IL-6, TNF-α
<i>Ou et al.</i> ³⁵	Osteoblastos MDCP-23	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 0.003% 	<ul style="list-style-type: none"> -Exposición celular. -Prueba de ELISA. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑IL-1,IL-6,IL-8 - ↓IL-10 - Sin diferencia significativa de citotoxicidad a 3 hrs

<i>Röhner et al.</i> ³⁶	Osteoblastos humanos	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 0.1% - Polihexanida 0.04% 	<ul style="list-style-type: none"> -Evaluación morfológica. - Evaluación celular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cambios morfológicos en ambos antisépticos - ↑ Reactantes de fase aguda solo con polihexanida 0.04%
<i>Sawada et al.</i> ⁹	Modelo Experimental en hueso cortical porcino	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 0.2% - Yodopovidona - H2H0 1% 	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluación de viabilidad celular a través de MTT. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Liberación de factores inflamatorios con clorhexidina - ↑ Viabilidad celular con clorhexidina -
<i>Yu et al.</i> ³⁷	Células madre dientes deciduos	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 0.1%,0.01%, 0.001%, 0.0001% 	<ul style="list-style-type: none"> - Ensayo clínico. - Secuencia de replicación autonómica. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ 50% de células con dilución de CHx 0.01% - ↓ Potencial de mineralización en todas las diluciones

<i>Prokshch. et al.</i> ³⁸	Osteoblastos humanos	- Melatonina	<ul style="list-style-type: none"> - Medir niveles de superóxido. - Morfología celular. - Medición de radicales libres. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ La protección con osteoblastos en contexto de citotoxicidad de CHX
<i>Chiang et a.</i> ³⁹	Osteoblastos en modelo animal (Hámsteres)	- Clorhexidina	<ul style="list-style-type: none"> - Medición de muerte celular. - Generación de anión superóxido. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Aniones de superóxido - ↑ Generación de radicales libres
<i>Rodrigues et al.</i> ⁴⁰	Osteoclastos humanos Osteoblastos humanos	<ul style="list-style-type: none"> - AH Plus™, - GuttaFlow™, - Tubliseal™, - Sealapex™ and - RealSeal 	<ul style="list-style-type: none"> - Exposición celular a compuestos durante 21 días. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ De actividad ALP - Efecto dosis dependiente - ↑ Alteración entre las dos líneas celulares

<i>Vörörs et al.</i> ⁴¹	Osteoblastos humanos	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 0.1% - Polihexamida 0.04% 	<ul style="list-style-type: none"> - Niveles de DHL. - Inspección microscópica de morfología celular. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Actividad de LDH - ↓ Células viables con ambas sustancias
<i>Scaffa et al.</i> ⁴²	Dentina Humana	<ul style="list-style-type: none"> - Clorhexidina 	<ul style="list-style-type: none"> - Vía de catepsinas (B,K,L) 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Actividad proteolítica

Discusión

El análisis a detalle de los artículos incluidos en esta revisión sistemática, muestra datos interesantes con relación al uso de la clorhexidina y los efectos que tiene sobre cultivos de diferentes células humanas; el artículo publicado por *Markel et al.*²⁸ señala que el uso de Irrisept 0.05% (Clorhexidina al 0.05%) genera cambios estructurales en la pared celular de osteoblastos humanos a las 24 horas de exposición, sin embargo, en comparación a otras dos sustancias (Clorpactin 2g y Bacitracin 33 UI/ml), los osteoblastos mostraron una recuperación total en su estructura celular al detener la exposición, considerándose como un efecto “reversible”. Mismo resultado que coincide con lo reportado por *Böhle et al.*³⁰, donde se utiliza la misma solución de Irrisept 0.05% (Clorhexidina 0.05%) sobre cultivo de osteoblastos humanos, presentando efectos citotóxicos, con una medición a través de recursos imagenológicos de microscopía por fluorescencia, conteo celular, y niveles séricos de Deshidrogenasa Láctica (DHL), concluyendo que una concentración de 0.05% de clorhexidina (aún menor a la utilizada en odontología) tiene efectos nocivos e irreversibles sobre los osteoblastos.

Contrastando con estos resultados asociados al uso de diluciones menores a las utilizadas en el ámbito clínico, *Liu et al.*³², llevaron a cabo la exposición de 3 líneas celulares (fibroblastos, mioblastos y odontoblastos humanos) a diferentes concentraciones de clorhexidina (0%, 0.002%, 0.2% y 2), los resultados mostrados en su estudio señalan resultados estadísticamente significativos solo para la capacidad citotóxica de la dilución del 2% de clorhexidina sobre las tres líneas celulares sometidas al experimento.

Las dosis y diluciones de la clorhexidina parece ser un factor que no representa diferencia estadísticamente significativa para generar daños irreversibles a los osteoblastos humanos; llevando al contexto clínico, *Song et al.*³¹ realizaron un estudio experimental de exposición de pre osteoblastos obtenidos de calvaria de ratones MC3T3-E1 a 6 sustancias bactericidas de uso común en odontología.

Este artículo a diferencia de los mencionados anteriormente y analizados en esta revisión sistemática reproduce fielmente el uso de marcas comerciales utilizadas en la práctica clínica diaria, específicamente la concentración de clorhexidina al 0.12%, la cual resalta las características citotóxicas sobre distintos linajes celulares al ser sometidos durante un periodo corto y prolongado de tiempo, tal como lo observado en el estudio de *Ugur et al.*³³ señalando que incluso al exponer a los osteoblastos humanos durante un periodo prolongado, comprendido desde 4 hasta 24 horas de exposición, solo el uso de clorhexidina a dosis mayores a las mostradas por *Markel et al.*²⁸ & *Böhle et al.*³⁰ genera un efecto citotóxico hacia los osteoblastos humanos aislados en este estudio.

Uno de los índices considerados como un marcador de daño celular y disminución de la viabilidad de los osteoblastos son precisamente los reactantes de fase aguda (proteína C reactiva, C3, C4, fibrinógeno), tal como lo señalan *Böhle et al.*³⁰. Utilizando una base bioquímica de la reacción que se genera a partir de la exposición de osteoblastos a la clorhexidina, *Abdul et al.*²⁹ mencionan que existe un efecto “potenciador” de reactantes de proteínas de fase aguda en procedimientos de extracción de terceros molares cuando se pone en contacto la superficie intervenida con gel de clorhexidina. Al igual, *Terry et al.*³⁴ señalan que el diacetato de clorhexidina posee efectos en los que reduce de manera significativa la expresión de IL-1, IL-10, IL-12, KC, MIP-1, IFN and IL-6; contrastando con lo encontrado por *Abdul et al.*²⁹, en donde se veía afectada la secreción solo de IL-6 y de TNF- α ; en el caso de este estudio, ambas soluciones estudiadas tiene efectos moduladores sobre marcadores inflamatorios en línea de osteoblastos humanos.

Poniendo en contexto la relación del uso de clorhexidina y su interacción específicamente con los osteoblastos humanos, tenemos que estos artículos publicados por *Abdul et al.*²⁹, *Böhle et al.*³⁰ & *Terry et al.*³⁴ podrían dar una base biológica a la respuesta generada con esta interacción (sustancia-células);

Ya que como sabemos, las interleucinas y los reactantes de proteínas fase aguda tienen un rol crítico en las fases inflamatorias, asociados a eventos pleitrópicos sobre distintas líneas celulares entre los cuales podemos incluir los osteoblastos.

Cabe señalar que durante cualquier estudio es imperativo poder cubrir cualquiera de las directrices que pudieran surgir durante la investigación; es por eso, que mediante esta revisión sistemática podemos dar pie a nuevas investigaciones que involucren la evaluación de distintas áreas del conocimiento; por tal motivo, y haciendo referencia al estudio publicado por *Ou et al.*³⁵, en el cual se evalúa una base molecular y bioquímica de la interacción de clorhexidina sobre osteoblastos humanos, se demostró que cualquier dilución de ésta sustancia por arriba de 0.0003% tiene la capacidad de inhibir el crecimiento celular de los osteoblastos, pero no tenía una relación significativa con la toxicidad medida a través de estrés oxidativo o liberación de citoquinas en este cultivo celular, lo que contradice lo observado por *Abdul et al. & Terry et al.*^{29,34} por tal motivo, sería importante realizar algún estudio posterior en el cual se analicen las distintas vías de cambios celulares tanto de manera estructural como bioquímica.

Continuando con un mismo punto de vista bioquímico, los resultados mostrados por los autores *Röhner et al.*³⁶, hacen referencia a los efectos estructurales y bioquímicos que generan dos sustancias (polihexanida 0.04% y clorhexidina 0.1% y 2%), enfocando dichos resultados a que existe un aumento en la liberación de sustancias pro inflamatorias así como citoquinas durante la interacción celular con la polihexanida 0.04% y la clorhexidina 0.1% y 2%.

La liberación de citoquinas y sustancias pro inflamatorias parecen ser una de las vías más comunes y generalmente referenciadas durante la interacción que tienen distintas sustancias antisépticas de uso clínico común y líneas celulares, el estudio mostrado por *Sawada et al.*⁹ quien difiere metodológicamente de la mayoría de artículos incluidos en esta revisión sistemática, al mostrar un modelo experimental similar al señalado por *Song et al.*³¹, utiliza un modelo experimental en hueso cortical porcino con el uso de digluconato de clorhexidina al 0.2%, teniendo como resultado la liberación VEGF, IL-1, TGF.

Además un dato interesante encontrado en este modelo experimental, es que la viabilidad celular (evaluada por MTS) fue mayor cuando se utilizó digluconato de clorhexidina al 0.2%, en comparación con otras soluciones.

El hecho de que el modelo propuesto por *Sawada et al.*⁹ difiera del resto de los cultivos celulares en artículos revisados previamente podría generar esta variante en la respuesta, tal como se muestra también en los resultados mostrados por *Yuan et al.*³⁷, donde utilizan la misma sustancia pero en interacción con células provenientes de dientes deciduos exfoliados genera una respuesta interesante, a pesar de ser células no diferenciadas aún, los efectos citotóxicos son los esperados, generando una respuesta de disminución de viabilidad celular dependiente del tiempo de exposición a la sustancia en estudio.

En el afán de conocer los mecanismos de citotoxicidad que genera la clorhexidina sobre células humanas, *Chiang et al.*³⁹, realizaron un estudio experimental en el cual buscan como objetivo el elucidar los efectos tóxicos como la citotoxicidad misma, el modo de muerte celular y la generación de aniones de superoxidación. Al igual que *Sawada et al.*⁹ & *Yuan et al.*³⁷, utilizaron un modelo experimental sobre Hámsteres mostrando que el uso de clorhexidina en este modelo experimental, generó altos niveles de radicales libres, provocando una disrupción en la estabilidad de la estructura celular causando su muerte.

Esta hipótesis podría ser utilizada sobre un modelo de osteoblastos humanos para determinar, si existe la misma vía de muerte celular o acaso hay una variante dependiente del tipo celular que altere los resultados. *Rodrigues et al.*⁴⁰, señalan también como una causa probable de muerte celular el hecho de que se genere una pérdida de la capacidad celular, en este caso de osteoclastos y osteoblastos humanos, al ser sometidos en su estudios a múltiples sustancias de uso odontológico, obteniendo resultados de respuesta dosis-dependiente de la función de ambos tipos celulares, disminuyendo su capacidad de cumplir con la función biológicamente establecida

Al analizar las causas de daño celular provocado por cualquier dilución y compuesto de clorhexidina, algunos autores como *Prokshch. et al.*³⁸, hacen referencia de alternativas que podrían funcionar para disminuir este daño causado por la exposición de los osteoblastos, en su estudio hacen referencia del uso de melatonina como un compuesto para protección a los osteoblastos, disminuyendo el estrés oxidativo que se genera en las células, sin embargo, esta alternativa aún debería ser sometida a distintas investigaciones para establecerla como una medida fiable y científicamente comprobada como protector de osteoblastos ante la acción tóxica de la clorhexidina.

Conclusión

La clorhexidina a pesar de ser considerado como uno de los antisépticos orales más accesibles en el mercado y con buena respuesta a su uso, ha demostrado presentar alteraciones estructurales, alteraciones bioquímicas y poseer un claro efecto citotóxico sobre los osteoblastos humanos, incluso cuando es utilizada a diluciones menores al 0.12% dosis que generalmente se utiliza en el ámbito odontológico, siendo esta citotoxicidad dependiente del tiempo de exposición a la sustancia.

Es así como se descarta la hipótesis sostenida en este trabajo de investigación, ya que de acuerdo a la literatura analizada, la disminución de la viabilidad celular de los osteoblastos humanos está presente incluso a dosis menores del 0.12% de uso en odontología, siendo además todos estos cambios dependientes del tiempo de exposición a la sustancia, generando no solo cambios de viabilidad, sino, cambios morfológicos y bioquímicos de manera permanente.

Cabe señalar, que aún es necesario el desarrollo de nuevas investigaciones para determinar con claridad cuáles son las vías por las que se generan estos cambios estructurales y bioquímicos que tiene como consecuencia la disminución de la viabilidad celular y la disminución de la capacidad regenerativa de este tipo de células.

Bibliografía

1. Ruppert N., Schlagenhauf U. La clorhexidina en odontología: Aspectos Generales. *Quintaesencia*. 2005; 18 (1): 12-23
- 2.- Bascones A., Morante S. Antisépticos Orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Av Periodon Implantol*. 2006; 18 (1):31-59.
- 3.- Akwagyiram I, Andrew B, Madure R, Colgan P, Yan N, Lynn M. A randomised clinical trial to evaluate the effect of a 67 % sodium bicarbonate containing dentifrice on 0.2 % chlorhexidine digluconate mouthwash tooth staining. *BMC oral health*. 2016; 16(79)
- 4.- Campos F, Aranha A, Nogueira I, Giro E, Hebling J, Costa C. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J appl oral sci*. 2010; 18 (1): 50-58
- 5.- Chimenos E. Antisépticos en medicina bucal: la clorhexidina. *JANO*. 2003: 35-38
- 6.- Swiatkowska M, kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A. Clinical implications of the growth- suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *International journal of molecular medicine*. 2016; 37 : 1594-1600
- 7.- Lee T, Hu C, Lee S, Chou M, and Chang Y. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *International Endodontic Journal*. 2010 ; 43: 430-435
- 8.- Chen H, Shi Q, Yao Y, Cao Y. Cytotoxicity of Modified No equilibrium Plasma with Chlorhexidine Digluconate on Primary Cultured Human Gingival Fibroblasts. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 2016; 36 (1): 137-141

- 9.- Sawada K, Robayasbi M, Kobayasbi E, Schabler B, Mitron R. Effects of Antiseptic Solutions Commonly Used in Dentistry on Bone Viability, Bone Morphology, and Release of Growth Factors. *J oral Maxillofacial surg.* 2015: 1-8
- Haraji A, Rakbsbon V. Single-Dose Intra-Alveolar Chlorhexidine Gel Application, Easier Surgeries, and Younger Ages Are Associated With Reduced Dry Socket Risk. *J oral Maxillofac Surg.* 2014; 72: 259-265
- 10.- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; Prisma Group. Preferred reporting items for systematic reviews and metaanalyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009; 6: e1000097.
- 11.- Urrutia G, Bonfill X. La declaración prisma: un paso adelante en la mejora de las publicaciones de la Revista Española de Salud Pública. *Rev Esp Salud Publica* 2013; 87: 99-102.
- 12.- Freuenthal N, Sternudd M, Jansson L, Wanffors K. double-blind randomized study evaluating the effect of intra- alveolar chlorhexidine gel on alveolar osteitis after removal of mandibular third molars. *Journal of oral and maxillofacial surgery.* 2014; 73(4): 600-605
- 13.- Akwagyiram I, Andrew B, Madure R, Colgan P, Yan N, Lynn M. A randomised clinical trial to evaluate the effect of a 67 % sodium bicarbonate containing dentifrice on 0.2 % chlorhexidine digluconate mouthwash tooth staining. *BMC oral health.* 2016; 16(79)
- 14.- Barajas L, Hernández M, Aguilar S, Guerrero M. Control de dolor post-extracción con clorhexidina en gel. *Revista odontológica latinoamericana.* 2011; 3 (2): 39-43
- 15.- Ching Y, Kuan Y, Lee T, Huang F, Chang Y. Assessment of the cytotoxicity of chlorhexidine by employing an in vitro mammalian test system. *Journal of dental science.* 2014; 9:130-135

16. - Abboud C, Souza E, Zandonadi E, Borges L, Miglioli L, Monaco F, Barbosa V, Cortez D, Blanco A, Braz A, and Monteiro K. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae on a cardiac surgery intensive care unit: successful measures for infection control. *Journal of hospital infections*. 2016; 94: 60-64
17. - Wood N, Jenkinson H, Davis S, Mann S, Sullivan D. Chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles as a novel antimicrobial coating for dental implants. *J Master Sci*. 2015; 26 (201): 1-10
- 18.- Singh H, Kapoor P, Meshrom G, Warhadpande M. Evaluation of substantivity of chlorhexidine to human dentin and its application in adhesive dentistry—an in vitro analysis. *Indian Journal of Dentistry*. 2011; 2 (2): 8-10
19. - Wang M, Chang C, Huang H, yeh Y, Lee T, Hung K. Chlorhexidine-related refractory anaphylactic shock: a case successfully resuscitated with extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of Clinical Anesthesia*. 2016; 34: 654-657
- 20.- Lorente L, Levona M, Jimenez A, Lorenzo L, Diosdado S, Marca L, Mora M. Cost/benefit analysis of chlorhexidine-silver sulfadiazine-impregnated venous catheters for femoral Access. *American Journal of Infection*. 2014; 42: 1130-1132
21. - Cattaneo D, McCormick L, Cordes D, Slawn A, Moris R. Crystal structure resolution of two different chlorhexidine salts. *Journal of Molecular Structure*. 2016; 1121: 70-73 ^[1]_{SEP}
- 22.- Röhner E, Hoff P, Gaber T, Lang A, Voros P, Buttgereit F, Perka C, Windisch C, Matzionlis G. Cytokine Expression in Human Osteoblasts After Antiseptic Treatment: A Comparative Study Between Polyhexanide and Chlorhexidine. *Journal of investigative surgery*. 2015; 28: 1-7
23. - Pommer B, Ovorack G, and Ulm C. Decontamination of autogenous bone grafts: Systematic literature review and evidence-based proposal of a protocol. *Quintessence international*. 2014; 42(2): 145-150

- 24.- Manano R, Oliveira M, Cosme L, Ferreira S, Garcia I, Carvalho A. Effect of topical application of chlorhexidine and metronidazole on the tissue repair of palatal wounds of rats: a clinical and histomorphometric study. *Oral and maxillofacial surgery*. 2015; 119 (5): 505-513
- 25.- Tu Y, Yang C, Chen R, Chen M. Effects of chlorhexidine on stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of the Formosan medical association*. 2015; 114: 17-22
- 26.- Leeds I, Galante D, Steinberg J, Hobson D, Pio C, Bleday R, Wick E. Implementing quality improvement: A two-institution comparison of patient adherence with preoperative chlorhexidine gluconate bathing. *Perioperative care and operating room management*. 2016; 3: 29-31
- 27.- Muñoz C, Linares a, Dard M, Blanco J. Mechanical and chemical implant decontamination in surgical peri-implantitis treatment: preclinical “in vivo” study. *J Clin Periodontol*. 2016; 43: 694-701
- 28.- Markel J., Bou T., Dietz P., Afsari A. The Effect of Different Irrigation Solutions on the Cytotoxicity and Recovery Potential of Human Osteoblast Cells In Vitro. *Arthroplasty Today*. 2021; 7:120-125
- 29.- Abdul D., Al-Saffar M. The Effect of Chlorhexidine Gel Foam on the Salivary Tumor Necrosis Factor and Interleukin 6 After Extraction of Lower Third Molar. *Dent J*. 2021; 21: 35-42
- 30.- Böhle S., Röhner E., Zippelius T., Jacob B., Matziolis G., Rohe S. Cytotoxic effect of sodium hypochlorite (Lavanox 0.08%) and chlorhexidine gluconate (irrissept 0.05%) on human osteoblast. *European Journal of Orthopedic Surgery & Traumatology*. 2021; reg. 5176-07
- 31.- Song I., Lee J., Park J. The effects of various mouthwashes on osteoblast precursor cells. *Open Life Sci*. 2019; 14: 376-383

- 32.- Liu J., Werner J., Kirsch T., Zuckerman J., Virk M. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts and osteoblasts. *J. Bone Joint Infect.* 2018; 3: 165- 172
- 33.- Ugur Z., Akpınar K., Hepokur C., Altunbas D. Evaluation of cytotoxicity of qmix ethylene diamintetraacetic acid and chlorhexidine on human osteoblast cell line. *Cumhuriyet Dental Journal.* 2018; 21: 202-208.
- 34.- Terry A., Rocha M., Marie C., Prakki A. Profiling cytokine levels in chlorhexidine and EGCG-treated odontoblast-like-cells. *Dental Materials.* 2018
- 35.- Ou Q., Tan L., Huang X., Lou Q., Wang Y., Lin X. Effect of matrix metalloproteinase 8 inhibitor and chlorhexidine on the cytotoxicity, oxidative stress and cytokine od MDCPC-23. *Dental Materials.* 2018.
- 36.- Röhner E., Hoff P., Gaber T., Lang A., Vörös P., Buttgereti F., Perka C., Windisch C., Matziolis G. Cytokine expression in human osteoblasts after antiseptic treatment: A comparative study between polyhexanide and chlorhexidine. *Journal of Investigations Surgery.* 2015; 28:1-7
- 37.- Tu Y., Yang C., Chen R., Chen M. Effects of chlorhexidine on stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2015; 114: 17-22
- 38.- Proksch S., Strobel S., Vach K., Abouassi T., Tomakidi P., Ratka P., and Hellwig E. Melatonin as a candidate therapeutic drug for protecting bone cells from chlorhexidine induced damage. *J Periodontol.* 2014; 379-389.
- 39.- Li Y., Kuan Y., Lee T., Huang F., Chang Y. Assessment of the cytotoxicity of chlorhexidine by employing an in vitro mammalian test system. *Journal of Dental Sciences.* 2014; 9:130-135
- 40.- Rodrigues C., Costa J., Capelas J., and Fernandes M. Behaviour of co-cultured osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers extracts. *Clin Oral Invest.* 2012

41.- Vörös P., Dobrindt O., Perka C., Windisch C., Matziolis G., Röhner E. Human Osteoblast damage after antiseptic treatment. *International Orthopaedics*. 2013.

42.- Scaffa P., Vidal C., Barros N., Gesteira T., Carmona A., Breschi L., Pashley D., Tjaderhane L., Tersariol I., Nascimento D., and Carrilho M. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res*. 2012; 91: 420-425