

Efeito modulador do gluconato de clorexidina em células epiteliais de *Drosophila melanogaster*

Modulatory effect of chlorhexidine gluconate on epithelial cells of Drosophila melanogaster

Adriene Rodrigues da Silva¹; Mirley Alves Vasconcelos²; Rosiane Gomes Silva Oliveira³

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

2 Doutora em Genética e Bioquímica. Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

3 Doutora em Genética e Bioquímica. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

E-mail: rosianegso@unipam.edu.br (autora correspondente).

Resumo: O gluconato de clorexidina é um antisséptico amplamente utilizado na área da saúde, devido a sua potente ação antimicrobiana; além disso, estudos recentes demonstram que esse composto é capaz de interferir nos mecanismos apoptóticos e na proliferação celular. Portanto, avaliar a ação da clorexidina no processo da carcinogênese justifica a realização do presente estudo, que teve por objetivo principal avaliar o efeito anticarcinogênico do antisséptico gluconato de clorexidina na carcinogênese induzida pela doxorubicina (DXR), utilizando o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em células epiteliais de *Drosophila melanogaster*. Para a realização do experimento, foram utilizados um controle negativo (água de osmose reversa), um controle positivo (Doxorrubicina DXR - 0,4mM) e três diferentes concentrações de clorexidina (5, 10 e 20 %) associadas à doxorubicina (DXR - 0,4mM). O tratamento foi realizado com larvas de 72 horas descendentes do cruzamento de fêmeas *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*. Os resultados revelaram que a clorexidina, nas concentrações testadas, foi capaz de reduzir, significativamente, a frequência de tumores induzidos pela doxorubicina quando comparado ao controle positivo. Concluiu-se que, nas presentes condições experimentais, a clorexidina apresentou efeito modulador, pois foi capaz de reduzir os danos induzidos pela DXR.

Palavras-chave: carcinogênese; doxorubicina; efeito modulador.

Abstract: Chlorhexidine gluconate is an antiseptic widely used in the health field due to its potent antimicrobial action. Recent studies have also shown that this compound is capable of interfering with apoptotic mechanisms and cell proliferation. Therefore, evaluating the action of chlorhexidine on the carcinogenesis process justifies the present study, which aimed to evaluate the anticarcinogenic effect of chlorhexidine gluconate in the carcinogenesis induced by doxorubicin (DXR), using the Epithelial Tumor Test (ETT) in *Drosophila melanogaster* epithelial cells. For the experiment, a negative control (reverse osmosis water), a positive control (Doxorubicin DXR - 0.4 mM), and three different concentrations of chlorhexidine (5, 10, and 20%) associated with doxorubicin (DXR - 0.4 mM) were used. The treatment was performed with 72-hour larvae descending from the cross of *wts/TM3* females with *mwh/mwh* males. The results showed that chlorhexidine, at the tested concentrations, was able to significantly reduce the frequency of tumors induced by doxorubicin compared to the positive control. It was concluded that under the present experimental conditions, chlorhexidine presented a modulating effect, as it was able to reduce the damage induced by DXR.

Keywords: carcinogenesis; doxorubicin; modulating effect.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônica que, nas últimas décadas, tem apresentado aumento significativo na frequência de novos casos, tornando-se um problema de saúde pública mundial (VIEIRA *et al.*, 2013). Dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o triênio de 2023 a 2025, apontam para a ocorrência de 704 mil novos casos por ano no Brasil (INCA, 2023). Essas informações são ainda mais alarmantes quando se trata do cenário mundial, pois, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), o número estimado de casos incidentes no mundo, entre os anos de 2020 a 2040, saltará de 19,3 milhões para 28,9 milhões (WHO, 2023).

Embora não se tenham estatísticas precisas sobre a prevalência e incidência de câncer em escala nacional na área da saúde animal (FLORES, 2016), sabe-se que o número de afecções neoplásicas na população animal vem aumentando consideravelmente (NARDI *et al.*, 2012), sendo uma das causas mais frequentes de morbidade e mortalidade em animais de companhia (TOGNI *et al.*, 2018). Os tumores são ainda mais comuns em animais idosos (BENTUBO *et al.*, 2007; LUZ, 2018).

Devido à gravidade dessa patologia, existe um potencial extraordinário em busca da descoberta de novos produtos farmacológicos anticarcinogênicos que possam combater o câncer e/ou melhorar efetivamente o tratamento de pacientes (COSTA-LUTOFO *et al.*, 2010).

Nesse contexto, ressalta-se o antisséptico gluconato de clorexidina, um composto antimicrobiano potencialmente eficaz e muito utilizado na área da saúde

(ANGELIERI, 2015). Esse antisséptico apresenta ainda, como característica desejável, a biocompatibilidade, ou seja, não causa irritação à pele do animal, podendo ser usado por qualquer paciente oncológico sem causar danos (BONAN; BATISTA; HUSSINE, 2011).

Estudos revelam ainda a associação positiva entre a clorexidina e o aumento da frequência de apoptoses, bem como sua ação nas alterações na propriedade de membrana de mitocôndrias (GIANNELLI *et al.*, 2008), na proliferação e morfologia celular (FARIA *et al.*, 2009); eventos estes que podem estar associados à redução de tumores. Diante do exposto, torna-se relevante uma avaliação que busque investigar a relação entre a clorexidina e seu efeito sobre a carcinogênese. A escolha da *Drosophila melanogaster* como organismo teste é justificada tanto pela facilidade de manipulação das linhagens (VIEIRA, 2018), quanto pela sua semelhança com características genéticas dos mamíferos, dentre elas a homologia entre o gene supressor de tumor *WTS*, presente na mosca, com o gene *LAST1*, presente em seres humanos (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

Nesse contexto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito anticarcinogênico do antisséptico gluconato de clorexidina, por meio do Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *Drosophila melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

O cloridrato de doxorrubicina (DXR), com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{11}HCl$ (CAS 25316-40-9), é um fármaco que está presente no mercado

com vários nomes comerciais, entre eles, Adriblastina® RD, sendo este fabricado e embalado por Activis Italy S.p - Nerviano, Milão/Itália. É registrado, importado e distribuído por Pfizer Laboratório Ltda. É apresentado sob forma de ampolas de 50mg com os seguintes compostos em sua constituição: cloridrato de doxorrubicina, manitol e lactose. Neste experimento, a DXR foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,4mM (SILVA; SANTOS; ORSOLIN, 2017).

O Gluconato de clorexidina (Clorex) tem vários nomes comerciais, entre eles o Riohex 2%, fabricado pela empresa Bioquímica. É apresentado em forma de refil, frasco com 800mL. Foram utilizadas 03 concentrações do gluconato de clorexidina (5, 10 e 20%) associadas à Doxorrubicina (0,4mM), sendo diluídas em água de osmose reversa. O controle negativo foi com água de osmose reversa.

2.2 TESTE DE TUMOR EPITELIAL (ETT) EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

O teste foi realizado mediante cruzamento de duas linhagens de *D. melanogaster* (*wts* e *mwh*). A linhagem *wts* foi disponibilizada pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, Estados Unidos, com o número de registro: Bloomington/7052. Já a linhagem *mwh/mwh* foi cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland), sendo mantida em estoque pelo LABCIM, Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas.

Para obtenção de larvas heterozigotas (*wts+/+mwh*) foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens

wts/TM3, Sb¹, com machos *mwh/mwh*. Após 48 horas, tanto os machos quanto as fêmeas foram transferidos para o meio de postura, para que as fêmeas depositassem seus ovos.

As larvas de 72 horas, descendentes desse cruzamento foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata (SPANÓ *et al.*, 2001) e hidratadas com clorexidina em três concentrações (5, 10 e 20%), associadas a doxorrubicina (0,4mM). As concentrações do referido antisséptico foram definidas a partir do trabalho de Reis e Vasconcelos (2018). Além dessas três concentrações, foram incluídos os grupos controle: grupo controle positivo com DXR 0,4 mM e o grupo controle negativo com água de osmose reversa. Após esse procedimento, as larvas ficaram expostas aos agentes químicos por cerca de 48 horas, até ocorrer a empupação. As moscas que eclodiram das pupas foram coletadas e armazenadas em frascos, devidamente identificados, contendo etanol 70%.

Após o período de coleta, procedeu-se à análise. Por meio da lupa estereoscópica, foram analisadas apenas moscas de pelos longos e finos, por serem portadoras do gene *WTS*. Para tanto, foi utilizada uma placa escavada contendo glicerina, em que as moscas foram analisadas individualmente para detecção da presença de tumores. A frequência de tumores foi registrada em planilha padrão, onde foi feita a descrição do número de tumores por área do corpo da *Drosophila melanogaster*.

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores no grupo experimental (nas concentrações testadas) e nos controles (negativo e positivo) foram calculadas utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-

Whitney, empregando o nível de significância $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Teste de Tumor Epitelial foi realizado para avaliar o potencial anticarcinogênico do Clorex quando associado à DXR no organismo teste *Drosophila melanogaster*. As diferentes concentrações do Clorex utilizadas em

combinação com DXR foram selecionadas com base em ensaio de sobrevivência (Figura 1).

Os dados de sobrevivência validaram o uso das três concentrações de Clorex (5, 10 e 20%) em combinação com DXR, que foram testadas em dois experimentos independentes. Os dados foram agrupados após verificação de que não havia diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre as repetições.

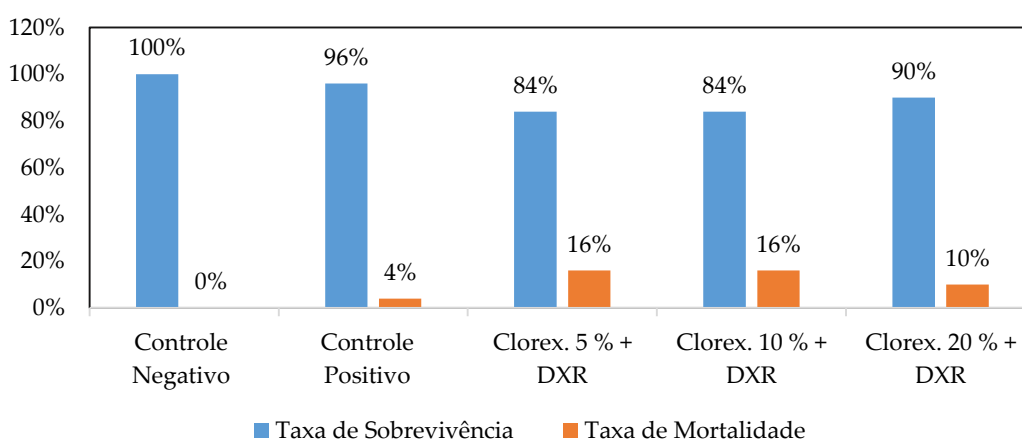


Figura 1: Taxas de mortalidade e sobrevivência de *Drosophila melanogaster* expostas ao controle negativo (água osmose reversa), ao controle positivo doxorrubicina (DXR - 0,4mM) e em três diferentes concentrações do antisséptico gluconato de clorexidina (Clorex) associadas à DXR

A Tabela 1 mostra a frequência de tumores nos segmentos do corpo de *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Clorex em combinação com DXR. Nos indivíduos tratados com controle positivo (DXR 0,4 mM), a frequência observada foi de 3,84 tumores por moscas, demonstrando que o organismo modelo foi sensível à indução tumoral, visto que a frequência de tumores foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior que no controle negativo. Esse resultado corrobora os resultados de Silva, Santos e Orsolin (2017), Santos e Oliveira (2018) e Pereira, Ramos e Vasconcelos (2019), que também

utilizaram a DXR nessa mesma concentração, como controle positivo.

Os indivíduos tratados somente com o controle negativo (água em osmose reversa) apresentam uma frequência de 0,27 tumores por moscas. De acordo com Alves e Nepomuceno (2012), essa discreta indução tumoral se deve a fatores de predisposição genética intrínseca do organismo modelo utilizado no presente experimento.

Embora os mecanismos pelos quais o gluconato de clorexidina exerce sua ação protetora reduzindo a frequência de tumores induzidos pela DXR não tenham sido diretamente avaliados nesta pesquisa, é possível que

tal efeito possa estar associado aos mecanismos de indução de morte celular. Faria *et al.* (2009) relataram, em estudo, que quando injetada na região subplantar da pata traseira de camundongos, a clorexidina induziu alterações necróticas na epiderme, derme e tecido subcutâneo em associação com uma resposta inflamatória reacional. Os autores relataram ainda que, em cultura de fibroblastos, a clorexidina induziu a diminuição da proliferação celular,

causou morte celular por apoptose e necrose, desestruturação do citoesqueleto, alteração da morfologia celular e estresse do retículo endoplasmático rugoso como consequência do acúmulo de proteínas nas cisternas. Além disso, a clorexidina causou o aumento da expressão de Hsp 70, de Grp78 (indicadores de estresse celular) e de BCL-2 (proteína anti-apoptótica).

Tabela 1: Frequência de clones tumores epiteliais observado em *Drosophila melanogaster* (n = 200), heterozigoto para o gene supressor de tumor *WTS*, tratadas isoladamente com os controles negativo (água), positivo doxorubicina (DXR - 0,4mM) e três diferentes concentrações do antisséptico gluconato de clorexidina (Clorex) associado à DXR

		Clorex (0%) + DXR (0,0 mM)	Clorex (0%) + DXR (0,4 mM)	Clorex (5%) + DXR (0,4 mM)	Clorex (10%) + DXR (0,4 mM)	Clorex (20%) + DXR (0,4 mM)
Número de tumores analisados	Olho	0,01(2)	0,02(4)	0,005(1)	0,05(1)	0,00(0)
	Cabeça	0,05(9)	0,46(92)	0,11(22)	0,13(25)	0,14(27)
	Asa	0,03(5)	1,52(303)	0,63(125)	0,29(58)	0,19(31)
	Corpo	0,14(27)	0,85(170)	0,17(33)	0,24(48)	0,27(53)
	Perna	0,05(9)	0,82(164)	0,27(53)	0,09(18)	0,13(25)
	Halter	0,01(2)	0,16(32)	0,02(4)	0,015(3)	0,02(4)
	Total	0,27(54)	3,84(767)	1,19(238)	1,77(153)	0,70(140)
	Frequência (nº de tumores / mosca)	0,27(54)	3,84(767) *	1,19(238) **	0,77(153) **	0,70(140) **
Redução (%)			68,98	80,05	81,75	

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p \leq 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo ($p \leq 0,05$).

DXR, doxorubicina.

Wyganowska-Swiatkowska *et al.* (2016), por sua vez, demonstraram, em um estudo *in vitro*, o efeito da clorexidina em cultura de células da linhagem CCD16 de fibroblastos humanos. Segundo os autores, a clorexidina causou diminuição gradual das células avaliadas, evidenciando alterações apoptóticas; indicando, portanto, influência negativa

da clorexidina tanto na proliferação quanto na morfologia celular.

Em adição, Widbillier, Althumairy e Diogenes (2018) avaliaram os efeitos clorexidina sobre a sobrevivência de células tronco da papila apical de humanos e concluíram que a clorexidina induziu efeito deletério sobre as células avaliadas, quando comparado ao grupo controle.

Nonami *et al.* (2016), por sua vez, correlacionaram a ação citotóxica da clorexidina com as propriedades eletroquímicas de membrana. Os autores verificaram que a despolarização de membranas atenuou a ação citotóxica da clorexidina em linfócitos tímicos de ratos. Contudo, manipulações para induzir a exposição da fosfatidilserina na superfície externa da membrana aumentaram a ação citotóxica da clorexidina, indicando que mudanças na propriedade eletroquímica das membranas afetaram a ação citotóxica da clorexidina. Assim, a clorexidina pode matar células submetidas fisiologicamente a apoptose, resultando em morte celular necrótica.

Por outro lado, Giannelli *et al.* (2008), ao estudarem diferentes linhagens celulares (osteoblásticas, endoteliais e fibroblásticas), constataram que, além do efeito tóxico da clorexidina na indução de morte celular, a clorexidina foi capaz de interferir na integridade do potencial de membrana de mitocôndrias e desencadear aumento do cálcio intracelular e estresse oxidativo.

Nesse contexto, é possível que a redução na frequência de tumores verificada na presente pesquisa tenha sido causada pelo aumento do estresse oxidativo, visto que um dos mecanismos de ação da DXR é a geração de radicais livres; possivelmente a combinação entre clorexidina e DXR aumentou a toxicidade celular. Contudo, outro mecanismo que pode estar relacionado com a redução na frequência de tumores é a capacidade do gluconato de clorexidina de alterar propriedades da membrana. Assim, é possível que a clorexidina tenha dificultado a entrada da DXR nas células, resultando redução na frequência de tumores.

4 CONCLUSÃO

Nas presentes condições experimentais, o antisséptico gluconato de clorexidina apresentou, em *D. melanogaster*, efeito modulador sobre a carcinogênese induzida pela doxorubicina. Tal efeito pode estar relacionado às diversas propriedades oncoprotetoras exercidas por esse antisséptico.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p. 125-40, 2012.

ANGELIERI, B. M. **Aplicações da clorexidina na saúde médica, odontológica e veterinária – revisão de literatura**. 2015. 40 f. Monografia (Especialização em Endodontia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2015.

BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, jul. 2007.

BONAN, R. F.; BATISTA, A. U. D.; HUSSINE, R. P. Comparação do uso do hipoclorito de sódio e da clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 237-244, 2011.

COSTA-LOTUFO, L. V.;
MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N.
N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.;
MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A.
Contribuição dos produtos naturais
como fonte de novos fármacos
anticâncer: estudos no Laboratório
Nacional de Oncologia Experimental da
Universidade Federal do Ceará. **Revista
Virtual de Química**, [S. l.], v. 2, n. 1, p.
47-58, 2010.

FARIA, G.; CARDOSO, C. R. B.; 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**, [S. l.], v. 234,
n. 2, p. 256-265, 2009.

FLORES, M. M. **Aspectos
epidemiológicos do câncer em cães da
região central do Rio Grande do Sul: 50
anos (1964-2013)**. 2016. 91 f. Tese
(Doutorado em Medicina Veterinária),
Universidade Federal de Santa Maria,
Centro de Ciências Rurais, Santa Maria,
2016.

GIANNELLI, M.; CHELLINI, F.;
MARGHERI, M.; TONELLI, P.; TANI, A.
Effect of chlorhexidine digluconate on
different cell types: a molecular and
ultrastructural investigation. **Toxicology
in Vitro**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 308-317,
2008.

INCA. Instituto Nacional do Câncer.
Estimativa. Disponível em:
[https://www.gov.br/inca/pt-
br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/i
ntroducao](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/introducao).

LUZ, A. C. A. **Neoplasias orais em cães
diagnosticadas no Laboratório de**

**Patologia Animal do Hospital
Veterinário da Universidade Federal de
Uberlândia: estudo retrospectivo**. 2018.
26 f. Trabalho de Conclusão de Curso
(Graduação em Medicina Veterinária),
Faculdade de Medicina Veterinária,
Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia, 2018.

NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.;
COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.;
RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ,
C. H. Prevalência de neoplasias e
modalidades de tratamentos em cães,
atendidos no Hospital Veterinário da
Universidade Federal do Paraná, Curitiba
- Paraná. **Archives of Veterinary Science**,
[S. l.], v. 7, n. 2, p. 15-26, 2012.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI,
T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IIDA, S.;
MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.;
HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H.
A. Human homolog of *Drosophila warts*
tumor suppressor, *h-warts*, localized to
mitotic apparatus and specifically
phosphorylated during mitosis. **FEBS
Letters**, [S. l.], v. 459, n. 2, p. 159-165, 1999.

NONAMI, K.; SAITOH, S.;
NISHIMURA-DANJOBARA, Y.;
ISHIDA, S.; OYAMA, Y. Chlorhexidine
possesses unique cytotoxic actions in rat
thymiclymphocytes: its relation with
electrochemical property of membranes.
**Environmental Toxicology and
Pharmacology**, [S. l.], v. 48, p. 17-21,
2016.

PEREIRA, R. C. R.; RAMOS, M. P. O.;
VASCONCELOS, M. A. Prospecção
química do extrato alcoólico das folhas
de *Antonia Ovata Pohl* (*Loganiaceae*) e
avaliação do seu efeito carcinogênico em
células somáticas de *Drosophila*

- melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 1, n. 16, p. 237-249, 2019.
- REIS, G. P. A.; VASCONCELOS, M. A. Avaliação do efeito carcinogênico do antisséptico Gluconato de Clorexidina por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Anais do COMEIA**, Patos de Minas, n. 11, 2018, p. 356.
- SANTOS, M. G. S.; OLIVEIRA, R. G. S. Efeito modulador do óleo de rícino, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 15, n. 1, p. 252-268, 2018.
- SILVA, C. S.; SANTOS, J. C.; ORSOLIN, P. C. Efeito redutor do viagra (Citrato de Sildenafil) sobre a frequência de tumores epiteliais induzidos pela doxorrubicina em *Drosophila melanogaster*. **Revista USP**, Ribeirão Preto, v. 50, n. 6, p. 365-370, 2017.
- SPANÓ, M. A.; FREI, H.; WÜRGLER, F. E.; GRAF, U. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, [S. l.], v. 16, p. 385-394, 2001.
- TOGNI, M.; CURTIS, A.; VARGAS, D. P.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R. A. Causas de morte e razões para eutanásia em gatos na Região Central do Rio Grande do Sul (1964-2013). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 741-750, abr. 2018.
- VIEIRA, G. B.; SOUSA, R. M.; SANTO, F. H. E.; TEIXEIRA, E. R. Impacto do câncer na autoimagem do indivíduo: uma revisão integrativa. **Revista Baiana de Enfermagem**, Salvador, v. 26, n. 2, p. 533-540, 2013.
- VIEIRA, N. M. **Expressão do gene codificador da Proteína HP1 em *Drosophila melanogaster***. 2018. 42 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia), Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- WIDBILLER, M.; ALTHUMAIRY, R. I.; DIOGENES, A. Direct and indirect effect of chlorhexidine on survival of stem cells from the apical papilla and its neutralization. **Regenerative Endodontics**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 156-160, 2018.
- WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. **Número estimado de casos incidentes de 2020 a 2040, todos os cânceres**. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=39&populations=903_904_905_908_909_935.
- WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA, M.; URBANIAK, P.; SZKARADKIEWICZ, A.; JANKUN, J.; KOTWICKA, M. Effects of chlorhexidine, essential oils and herbal medicines (Salvia, Chamomile, Calendula) on human fibroblast *in vitro*. **Central European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 1-7, 2016.