

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTIMATIVA DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO FORMOCRESOL,
UM COMPOSTO UTILIZADO NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA**

MARIA EMILIA SANTOS PEREIRA RAMOS

Fortaleza

2004

MARIA EMILIA SANTOS PEREIRA RAMOS

ESTIMATIVA DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO FORMOCRESOL,
UM COMPOSTO UTILIZADO NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Departamento
de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade
de Medicina da Universidade Federal do
Ceará como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia Clínica

Orientadora: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa

Co-orientadora: Profa. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Fortaleza

2004

R144e Ramos, Maria Emilia Santos Pereira

Estimativa do Potencial Genotóxico do Formocresol, um Composto Utilizado na Prática Odontológica / Maria Emilia Santos Pereira Ramos. – Fortaleza, 2004.
97 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Cláudio do Ó Pessoa.

Co-Orientador: Profa. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Testes de mutagenicidade. 2. Formocresol. 3. Genotoxicidade. I. Título.

CDD 615.9

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho dessa dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas de ética científica.

Maria Emilia Santos Pereira Ramos

Dissertação aprovada em 17 de maio de 2004.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa

Depto. de Fisiologia e Farmacologia, UFC

Orientadora da Dissertação

Profa. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Depto. de Ciências Biológicas, UEFS-BA

Co-orientadora da Dissertação

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Depto. de Fisiologia e Farmacologia, UFC

Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo

Depto. de Fisiologia e Farmacologia, UFC

A DEUS, que através da sua palavra: “os que confiam no Senhor são como os Montes de Sião, que nunca se abalam, mas permanecem firmes para sempre”. Foram nessas palavras e em muitas outras, que encontrei forças para continuar, e enfrentar as dificuldades.

**Ao meu colega, amigo,
companheiro e principalmente meu
marido Tercio, por ter compartilhado
mais uma difícil jornada. E aos meus
filhos João Victor e André por terem
enfrentado juntos comigo este
momento.**

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, em especial a minha mãe que tanto colaborou nos momentos mais difíceis. Não é fácil, querer fazer a coisa certa enfrentando tantas adversidades, é neste momento que a família faz a diferença.

À minha irmã **Patrícia** pela intensa colaboração durante todo o mestrado.

À minha orientadora **Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa** por sua dedicação a minha pesquisa, ao seu incentivo, mostrando sempre, como vencer obstáculos mesmo quando eles parecem intransponíveis.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira**, com carinho, minha também orientadora, pela disponibilidade de tempo, paciência e credibilidade a uma cirurgiã-dentista no mundo da genética.

À **Profa. Dra Maria Elisabete Amaral de Moraes**, pela recepção, apoio à grávida mestranda, por suas orientações durante todo o mestrado e pelo seu exemplo profissional.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho** pela recepção carinhosa e por maravilhosos ensinamentos.

Ao **Dr. Orestes e equipe**, pela parceria durante toda a parte experimental no Biotério da UEFS-BA.

À **Profa. Dra Susie Oliveira** pelo preparo técnico para realização do Teste de Micronúcleo

Às bolsistas **Caliandra Araújo e Danusa Hohlenwerger** pela dedicação e esforço para a execução desta dissertação e, certamente sem a colaboração delas, tudo seria bem mais difícil.

Aos meus colegas de disciplina na UEFS-BA, **Valéria Freitas, Fernando Bastos Júnior, Maria do Carmo Nagahama e Tecia Alves**, pela colaboração e compreensão, meu muito obrigada.

Aos colegas do **Núcleo de Câncer Oral** da UEFS-BA pelo apoio.

Aos meus colegas de disciplina na Bahiana, **Tercio Carneiro Ramos e Maria Cecília F. Azoubel**, pela integração durante o mestrado.

À **Profa. Dra. Ana Paula Nunes** pela sua valiosa colaboração na análise histopatológica.

Ao bolsista **Bruno Coelho Cavalcante** pela sua dedicação durante a realização dos experimentos nos laboratórios do LOE.

À minha colega de mestrado **Ernestina Camurça**, pelo carinho que sempre dispensou a nossa turma e em especial a mim, pelo apoio durante a conclusão da dissertação.

À toda a equipe do **Laboratório de Genética** da UEFS-BA, pela recepção e apoio durante a fase experimental do meu trabalho.

À toda a equipe do **Laboratório Oncologia Experimental** da UFC, pela recepção e apoio durante a elaboração da dissertação.

Aos meus colegas de mestrado pelo companheirismo e amizade. E aos amigos da UNIFAC, pelo carinho sempre dispensado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Considerações Gerais.....	17
1.2 Características Químicas do Formocresol: Formaldeído, Cresol e Glicerina..	19
1.3 Formocresol na Prática Odontológica.....	21
1.4 Toxicidade Pré-Clínica do Formocresol: Formaldeído.....	23
1.5 Mutagenicidade e Carcinogenicidade do Formocresol: Formaldeído.....	25
1.6 Testes de Avaliação de Genotoxicidade.....	27
1.6.1 Teste de Micronúcleo.....	27
1.6.2 Teste Cometa.....	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 Materiais.....	37
3.1.1 Toxicidade Aguda.....	37
3.1.2 Teste de Micronúcleo em Eritrócitos Policromáticos de Medula Óssea de Camundongos.....	37
3.1.2.1 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	37
3.1.2.2 Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes.....	38
3.1.3 Análise Histopatológica Hepática.....	38
3.1.4 Teste Cometa em Linfócitos Humanos <i>in vitro</i>	38
3.1.4.1 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	38
3.1.4.2 Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes.....	39
3.2 Método.....	39
3.2.1 Toxicidade Aguda.....	39
3.2.2 Teste de Micronúcleo.....	39
3.2.2.1 Animais e Ambiente de Experimentação.....	39
3.2.2.2 Grupos Amostrais.....	40
3.2.2.3 Obtenção e Preparação do Material para Análise.....	42

3.2.2.4 Análise de Micronúcleo.....	48
3.2.2.5 Análise Estatística.....	49
3.2.3 Análise Histopatológica.....	50
3.2.3.1 Obtenção, Preparo e Análise do Material.....	50
3.2.4 Teste Cometa.....	50
3.2.4.1 Seleção de Voluntários e Obtenção do Material para Análise.....	50
3.2.4.2 Procedimento.....	50
3.2.4.2.1 Isolamento e Manutenção dos Linfócitos.....	50
3.2.4.2.2 Execução do Teste Cometa.....	52
3.2.4.2.3 Análise Estatística.....	55
3.3 Aspectos Éticos da Pesquisa.....	55
3.3.1 Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos.....	55
3.3.2 Comitê de Ética em Pesquisa em Animais.....	56
4 RESULTADOS.....	57
4.1 Avaliação da Toxicidade do Formocresol.....	59
4.2 Análise de Micronúcleo (MN).....	60
4.2.1 Ocorrência de Micronúcleos entre os Tempos de Sacrifício 24h e 48h.....	60
4.2.2. Ocorrência de Micronúcleos nas Diluições do Formocresol, Controle Positivo e Negativo para os Animais Sacrificados com 24h.....	60
4.2.3. Ocorrência de Micronúcleos nas Diluições do Formocresol, Controle Positivo e Negativo para os Animais Sacrificados com 48h.....	62
4.3 Análise do Cometa.....	63
4.4 Análise Histológica do Fígado.....	65
5 DISCUSSÃO.....	72
Considerações Finais.....	78
6 CONCLUSÃO.....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	–	Fosfatase Alcalina
CEUA	–	Comitê de Estudo no Uso de Animais
COBEA	–	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO	–	Dimetilsufóxido
DNA	–	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetracético
GL	–	Grau de Liberdade
LDL	–	Dehidrogenase Láctica
LOE	–	Laboratório de Oncologia Experimental
MN	–	Micronúcleo
NCE	–	Eritrócito Normocromático
PBS	–	Phosphate Buffer Solution
PCE	–	Eritrócito Policromático
RNA	–	Ácido Ribonucléico
TGO	–	Transaminase Oxalato Glutâmico
UEFS	–	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFC	–	Universidade Federal do Ceará
UNIFAC	–	Unidade de Farmacologia Clínica

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Identificação dos animais.....	41
FIGURA 2	Administração por via intraperitoneal das drogas testadas.....	41
FIGURA 3	Abertura da cavidade abdominal do camundongo para posterior remoção do fêmur.....	42
FIGURA 4	Fêmures dos camundongos após limpeza externa.....	43
FIGURA 5	Corte da epífise proximal dos camundongos.....	43
FIGURA 6	Agulha introduzida no fêmur após corte da epífise proximal, conectada à seringa contendo 0,5 mL de soro fetal bovino.....	44
FIGURA 7	Fêmur submergido no tubo de centrífuga, com 3 mL de soro fetal bovino, para remoção da medula óssea.....	44
FIGURA 8	Aspecto do fêmur após retirada da medula óssea.....	45
FIGURA 9	Sedimentação dos linfócitos após centrifugação com soro fetal bovino.....	45
FIGURA 10	Sedimento ressuspendido com o auxílio da pipeta Pasteur.....	46
FIGURA 11	Confecção do esfregaço nas lâminas.....	46
FIGURA 12	Coloração das lâminas com corante Leishman puro (permanência 3 mim.) e diluído (permanência 15 mim.).....	47
FIGURA 13	Lâminas coradas e montadas com lamínulas, para posterior análise.....	47
FIGURA 14	Fotomicrografia apresentando Eritrócito Policromático (PCE) micronucleado (HE 40X).....	48
FIGURA 15	Fotomicrografia apresentando Eritrócito Policromático (PCE) micronucleado (HE 100X).....	49
FIGURA 16	Fotomicrografia de esfregaço de células da medula óssea: A) Eritrócito Policromático (PCE); B) Eritrócito Normocromático (NCE) (HE 40X).....	49
FIGURA 17	Isolamento dos linfócitos.....	51
FIGURA 18	Apresentação das lâminas com camada de agarose.....	52
FIGURA 19	Cuba com solução de lise, protegida da luminosidade.....	53
FIGURA 20	Sistema de eletroforese.....	54
FIGURA 21	Padrão de escores.....	55

FIGURA 22	Fotomicrografia de célula em <i>crosslinks</i> , após teste com diluições do formocresol (HE 40X).....	64
FIGURA 23	Fotomicrografia de um campo com células em <i>crosslinks</i> , após teste com diluições do formocresol (HE 40X).....	65
FIGURA 24	Fotomicrografia histológica do Fígado do animal controle negativo. Apresentando leve tumefação turva e dilatação da veia centrolobular (HE 20X).....	66
FIGURA 25	Fotomicrografia histológica do Fígado do animal controle negativo. Presença de congestão portal (HE 20X).....	66
FIGURA 26	Fotomicrografia histológica do Fígado (diluição 1:500 do formocresol). Presença de foco inflamatório e hemorragia sinusoidal (HE 40X).....	67
FIGURA 27	Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:500 do formocresol). Presença de hiperplasia das células de Kupffer (HE 40X).....	67
FIGURA 28	Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:1000 do formocresol). Presença de hemorragia sinusoidal (HE 40X).....	68
FIGURA 29	Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:100 do formocresol). Presença de hiperplasia das células de Kupffer e tumefação turva (HE 40X).....	68
FIGURA 30	Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:100 do formocresol). Apresentando dilatação portal e tumefação turva (HE 20X).....	69
FIGURA 31	Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:50 do formocresol). Apresentando hemorragia sinusoidal e hiperplasia das células de Kupffer e tumefação turva (HE 40X).....	69
FIGURA 32	Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:50 do formocresol). Apresentando tumefação turva e dilatação portal (HE 20X).....	70
FIGURA 33	Fotomicrografia do Fígado (ciclofosfamida). Presença intensa tumefação turva (HE 20X).....	70
FIGURA 34	Fotomicrografia do Fígado (ciclofosfamida). Presença de hiperplasia das células de Kupffer (HE 40X).....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Avaliação da toxicidade por tempo de observação e concentração..	59
TABELA 2	Valores de χ^2 e p obtidos na comparação das mortes em cada grupo de diluição em função do tempo de sacrifício.....	60
TABELA 3	Análise da ocorrência de MN nos grupos em função do tempo de sacrifício.....	60
TABELA 4	Dados relativos à ocorrência de MN no grupo sacrifício 24h.....	61
TABELA 5	Comparação da ocorrência de MN no grupo sacrifício 24h.....	62
TABELA 6	Dados relativos à ocorrência de MN no grupo sacrifício 48h.....	62
TABELA 7	Comparação da ocorrência de MN no grupo sacrifício 48h.....	63
TABELA 8	Comparação na ocorrência de comentas e formação de <i>crosslinks</i> ..	64

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Proporção entre os animais mortos e animais sacrificados (analisados) para o período de 24h e 48h.....	58
-----------	--	----

RESUMO

Estimativa do Potencial Genotóxico do Formocresol, um Composto Utilizado na Prática Odontológica. MARIA EMILIA SANTOS PEREIRA RAMOS. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia Clínica. Orientador: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa, co-Orientador: Profa. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira.

Na prática odontológica vários fármacos são utilizados com diversas finalidades incluindo-se, entre eles, os agentes capeadores das polpas de dentes decíduos. O formocresol é o composto mais utilizado em pulpotomias de dente decíduos na diluição de 1:5 da formulação de Buckley. A segurança clínica do formocresol tem sido questionada em virtude de possuir na sua composição o formaldeído, composto sabidamente tóxico e carcinogênico. O presente trabalho tem como objetivo, estimar o potencial genotóxico do formocresol em diferentes diluições a partir da amostra comercializada. Esse estudo foi avaliado pelos ensaios de curta duração *in vivo* e *in vitro*. Os animais foram tratados com o formocresol nas diluições de 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000, e após 24h e 48h sacrificados, sendo posteriormente a medula óssea extraída, e o material submetido às observações de perdas cromossômicas (micronúcleos) em eritrócitos policromáticos (PCE), além disso, os fígados dos animais tratados (grupo 24h) foram submetidos à análise histológica. No ensaio *in vitro* o formocresol nas diluições de 1:750, 1:1000 e 1:2000 foram incubados em cultura de linfócitos humanos por 45 min., sendo em seguida submetido ao procedimento de análise do teste cometa. Na avaliação da incidência de micronúcleo, no grupo 24h, não houve diferença quando da comparação entre as diluições de 1:50, 1:100, 1:500 e controle negativo, apenas quando comparada à diluição de 1:1000 em relação às demais houve diferença significativa ($p < 0,001$). Porém, quando a diluição de 1:1000 foi comparada à ciclofosfamida, não existiu diferença significativa ($p > 0,50$). Enquanto a diluição 1:1000 e da ciclofosfamida diferiram estatisticamente do controle negativo, no grupo 24h ($p < 0,01$). Entretanto, na observação do grupo 48h, apenas a ciclofosfamida apresentou incidência de micronúcleos, diferindo estatisticamente dos grupos tratados e controle ($p < 0,001$). Já no estudo histológico do fígado, foi observado hepatotoxicidade nos animais tratados do grupo 24h. Na análise do cometa, foi observado que em todas as diluições do formocresol utilizadas houve a formação de *crosslinks* no DNA, fator esse determinante para inferir o potencial genotóxico do formocresol. Concluímos que o formocresol é tóxico e, quando diluído até 1000 vezes, é potencialmente genotóxico e mutagênico.

Palavras-chave: testes de mutagenicidade, formocresol, genotoxicidade

ABSTRACT

Evaluation of Genotoxic Potential of Formocresol, used compound in the Odontology Practice. MARIA EMILIA SANTOS PEREIRA RAMOS. Essay presented to Post-Graduation Program of Pharmacology of Physiology and Pharmacology Department of Ceará Federal University as prerequisite for obtaining the degree of Master of Science. Supervisor: Prof. Dr. Claudia do Ó Pessoa, co-Supervisor: Prof. Dr. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira.

In odontology practice, many drugs used have different purposes, such as primary teeth pulp covers. The Formocresol is the medicine most used in pulpotomy of primary teeth in 1:5 dilution of Buckley's formulation. The clinical safety of Formocresol has been questioned since its formulation is composed by formaldehyde, which is known as a toxic and carcinogenic compound. The present study has the objective of estimate the genotoxic potential of Formocresol in different dilutions using the commercialized sample. This study was evaluated by short period trials *in vivo* and *in vitro*. The animals were treated with Formocresol in the dilutions of 1:50, 1:100, 1:500 and 1:1000, and after 24h and 48h, they were sacrificed afterwards with the medulla extraction. This material was submitted to chromosomal damage observations (micronuclei) in polychromatic erythrocytes (PCE). The liver of the animals treated (24h group) were also submitted to histological analysis. In *in vitro* trial, the 1:750, 1:1000 and 1:2000 dilutions of Formocresol were incubated in human lymphocyte culture for 45 min and to comet test analysis next. There was no difference in micronuclei incidence evaluation when compared to 1:50, 1:100 and 1:500 dilutions and to negative control, in the 24h group. The difference appeared only when compared the 1:1000 dilution to the others, with a significant difference of $p < 0.001$. However, when the dilution of 1:1000 was compared to the cyclophosphamide there was no significant difference ($p > 0.50$). Meanwhile, the dilution of 1:1000 and of cyclophosphamide was statistically different from the negative control, in the 24h group. However, in the 48h group observations, only the cyclophosphamide presented micronuclei incidence, statistically differing from the treated groups and control ($p < 0.001$). In the liver histological study it was observed hepatotoxicity in the animal treated in the 24h group. In comet analysis it was observed that in all used dilutions there was DNA crosslinks formation, which was an important factor to give a genotoxic potential to Formocresol. It was concluded that Formocresol is toxic and when diluted to 1:1000 is potentially genotoxic and mutagenic.

Keywords: test mutagenic, formocresol, genotoxicity

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Na prática odontológica vários fármacos são utilizados com diversas finalidades incluindo-se, entre eles, os indicados como medicação curativa intracanal pós-operatória, ou como agentes capeadores das polpas de dentes decíduos. Historicamente, o combate às infecções da cavidade pulpar e do periápice era realizado através da aplicação de métodos de esterilização e desinfecção, assim como através do uso de agentes químicos muitos dos quais apresentam efeitos irritantes. Mais recentemente, resultados de novas pesquisas no campo da endodontia têm apontado para as vantagens de práticas mecânicas em substituição àquelas preconizadas na chamada “era química do tratamento dos canais”. Apesar disso, o uso de medicação intracanal continua sendo prática na clínica odontológica, principalmente através de aplicações de formocresol sobre polpas decíduas inflamadas, formulação essa excessivamente tóxica para os tecidos pulpares (DE DEUS, 1992).

Diversas drogas são utilizadas no tratamento de canal, podendo ser classificadas em dois tipos: 1) as drogas não específicas, como paramonoclorofenol canforado, glutaraldeído e formaldeído, consideradas como anti-sépticos e, 2) as drogas específicas a exemplo dos antibióticos. As drogas consideradas não-específicas são voláteis e apresentam baixa tensão superficial, além das propriedades fisicoquímicas que as caracterizam. Tais drogas apresentam, reconhecidamente efeitos citotóxicos e atividade antimicrobiana muito variada. Tendo ainda, o potencial de fixar tecidos vitais e necróticos, sendo desse modo consideradas extremamente irritantes (DE DEUS, 1992; GRAFSTROM et al., 1993).

Entre as drogas não específicas a mais conhecida é o formaldeído, um dos constituintes do formocresol, formulação largamente utilizada nas pulpotomias de dentes decíduos na clínica odontológica pediátrica.

A fórmula original do formocresol, empregada a partir de 1904, e denominada de Formocresol de Buckley, era constituída de formaldeído e cresol em partes iguais. No decorrer do tempo, foi sendo modificada (BERGER, 1965), de modo que as preparações disponíveis atualmente no mercado apresentam diferentes concentrações. Destas, as mais utilizadas incluem aquela, proposta também por Buckley em substituição à formulação original, composta por 19% de formaldeído, 35% de cresol, 15% de glicerina, e a qual é denominada “Sultan” composta de 48,5% de formaldeído, 48,5% de cresol e 3% de glicerina.

O formocresol de Buckley, na prática clínica odontológica é, atualmente utilizado na concentração de 1:5 (LOOS et al., 1973) e aplicado sobre os cotos pulpares com um pequeno chumaço de algodão, que neles é deixado atuar por 5 min de permanência local (JUDD e KENNY, 1987; KING et al., 2002).

O formocresol é utilizado com esta finalidade porque estudos clínicos e radiográficos demonstram um índice de sucesso da técnica de pulpotomia entre 70% a 100% (DOYLE et al., 1962; ROLLING e THYLSTRUP, 1975; FUKS e BIMSTEIN, 1981; MATEWSON e PRIMOSCH, 1995; CAMERON e WIDMER, 1997).

O uso indiscriminado e não controlado do formocresol, suscita a necessidade de investigações que avaliem os efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, de medicamentos contendo aldeídos, uma vez que trabalhos de revisão apontam para o seu potencial mutagênico (LEWIS e CHESTNER, 1981; KENNY e JUDD, 1987). Estudos de curta duração demonstraram o potencial mutagênico do formaldeído em drosófilas (RAPOPORT, 1946) e em culturas de células humanas (GOLDMACHER e THILLY, 1983). Estes resultados não devem, contudo, serem extrapolados para avaliação do risco mutagênico e carcinogênico para o homem.

Dado o largo uso do formocresol na prática odontológica pediátrica e considerando os efeitos tóxicos, já bem documentados, e os suspeitos efeitos mutagênicos no homem, necessário se fazem estudos voltados para a identificação dos potenciais e reais efeitos danosos desta medicação à saúde humana. Além de que, segundo a legislação em Vigilância Sanitária, o formocresol como produto

odontológico, segundo a Lei nº 5.991, 17 de Dezembro de 1973, Capítulo 1, Artigo 4 está classificado como correlato, e dessa maneira para obter seu registro de comercialização não necessita de estudos de toxicidade pré-clínica. Por tudo isso, é de extrema relevância estudar o potencial genotóxico do formocresol.

1.2 Características Químicas do Formocresol: Formaldeído, Cresol e Glicerina

O formocresol tem dois constituintes majoritários na formulação atualmente comercializada, o formaldeído, e o cresol nas concentrações de 19% e 35%, respectivamente.

O formaldeído pode ser produzido por diversas fontes endógenas e exógenas (FEINMAN, 1988; GRAFSTROM, 1990). Dentre as origens exógenas, esta substância é encontrada na fumaça do tabaco, em gases emitidos pelos automóveis e em várias resinas e materiais dentários. Pode ser formado, também, em menor proporção por reações de dimetilações intracelulares de vários compostos como alguns esteróides e N-nitrosaminas (GRAFSTROM et al., 1993). O formaldeído é uma substância química altamente reativa, principalmente com grupos amino, resultando na formação de adutos de Schiffs que podem, conseqüentemente, formar ligações cruzadas (AUERBACH et al., 1977). Esta substância exerce também um efeito tóxico no organismo através de reatividade não específica com proteínas e ácidos nucleicos (FELDMAN, 1973; GRAFSTROM et al., 1983).

Em sua forma gasosa, o formaldeído é estável em altas concentrações, constituindo-se em um gás incolor cujos vapores são irritantes para as mucosas dos olhos, nariz e pele. A mistura deste gás com água, forma um composto chamado de formalina, que é responsável pela fixação dos tecidos e ação bactericida do composto (CÁRDENAS, 1968; MATEWSON e PRIMOSCH, 1995). Ao elevar a concentração de formaldeído em solução aquosa, observa-se a formação de um composto que se polimeriza à temperatura ambiente, chamado de paraformaldeído, o qual é responsável pela conservação da substância. Para evitar este fenômeno, foi

acrescentada à formulação do formocresol a glicerina, a qual diminui a formação de paraformaldeído (CÁRDENAS, 1968; SILVA, 2002).

Em sua forma líquida, o formaldeído, é utilizado como desinfetante de instrumentos cirúrgicos, podendo destruir, dependendo da concentração, todos os microorganismos, inclusive em suas formas de esporos (CHAMBERS, 2003). Seu uso em formulações empregadas na prática odontológica tem a finalidade de fixar tecido pulpar, o que ocorre através de sua interação com as proteínas celulares, provocando uma trombose que resulta em área isquêmica (MYERS et al., 1978; MYERS et al., 1981). Vale ressaltar, contudo, que sua ação sobre este tecido é considerada irritante, portanto prejudicial.

O cresol presente na fórmula do formocresol, na proporção de 35%, como dito acima, apresenta uma relação muito estreita com o eugenol, sendo ambos derivados fenólicos do anel benzeno e, por tanto, tem um grande poder antiséptico como todos os compostos fenólicos. O cresol é acrescentado na solução para diminuir a irritação produzida pelo formaldeído, bem como para potencializar o efeito germicida (GARCIA-GODOY e OLIVO, 1977; RANLY, 1985; RANLY e HORN, 1987).

A glicerina, veículo da solução de formocresol, é obtida por saponificação de gorduras e tem larga utilização como solvente, conservante e edulcorante em várias fórmulas de medicamentos. Sua ação na fórmula do formocresol na concentração de 15%, além de veículo, é atenuar o poder irritante do formaldeído (GUEDES-PINTO, 1995).

No comércio, a indústria farmacêutica Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda. é uma das responsáveis pela fabricação do formocresol. Segundo seu registro técnico, a formulação obedece a padrões orientados pelas pesquisas atuais, sendo, mais diluída que a composição padrão de "Buckley", apresentando a mesma eficácia e uma maior compatibilidade biológica. Tem a função de fixar polpas vivas, mantendo-as inertes e possibilitando a conservação do dente decíduo até um momento próximo à queda fisiológica, bem como, uma potente ação antimicrobiana decorrente dos seus componentes (ANEXO 1).

1.3 Formocresol na Prática Odontológica

Juddy e Kenny (1987), em artigo de revisão, afirmam que a pulpotomia com formocresol é um procedimento comumente utilizado para o tratamento de polpas inflamadas em dentes decíduos. Esta técnica introduzida desde 1904, foi aceita pelos profissionais fundamentados apenas em conceitos empíricos.

Pulpotomia tem sido descrita como a amputação da porção coronária da polpa dentária inflamada, seguida do tratamento dos remanescentes pulpare, com vitalidade, por meios farmacológicos e/ou não farmacológicos (CORRÊA, 1998). Este procedimento de acordo com Pinkham (1996) baseia-se na premissa de que o tecido radicular está sadio e é capaz de cicatrizar após amputação cirúrgica da polpa coronal.

Dentre os vários medicamentos utilizados como agentes capeadores das polpas de dentes decíduos, o mais empregado é o Formocresol, conforme pode ser inferido na literatura (KOCH et al., 1992; ISSÃO e GUEDES-PINTO, 1993; PINKHAM, 1996; GUEDES-PINTO, 1995; MATEWSON e PRIMOSCH, 1995; CORRÊA, 1998).

O capeamento pulpar não deve induzir qualquer alteração patológica persistente no tecido pulpar residual, mas deve protegê-lo e preservá-lo. Segundo Pinkham (1996), o medicamento ideal para recobrimento da polpa deveria apresentar as seguintes características: ser bactericida, não causar dano à polpa e estruturas circundantes, favorecer a cicatrização da polpa radicular e não interferir no processo fisiológico de reabsorção radicular. O composto ideal, que atenda a estes requisitos, não foi, contudo, identificado.

Avaliações histológicas demonstraram que após a utilização do formocresol sobre a polpa, são observadas quatro camadas: a primeira de tecido fixado e acidófilo, a segunda corada palidamente, apresentando um número reduzido de células e fibras (atrofiada), a terceira sendo composta por uma camada com concentração de células inflamatórias e a quarta camada, formada de tecido normal

(MASSLER e MANSUKHANI, 1959; DOYLE et al., 1962; BERGER, 1965). Block e seus colaboradores (1983), contudo, observaram que, após pulpotomias realizadas em dentes de cães, o efeito mais freqüente desse medicamento é a inflamação crônica ou necrose parcial da polpa residual e não fixação tecidual ou mumificação. A despeito das alterações teciduais induzidas pelo formocresol, seu uso terapêutico muito raramente causa sintomas clínicos mesmo quando realizado um acompanhamento de 2 a 3 anos (KOCH et al., 1992).

Atualmente, a técnica em única consulta, em que o formocresol é sobreposto à polpa durante 5 a 10 min (GUEDES-PINTO, 1995) é a mais preconizada, substituindo a descrita por Issão e Guedes-Pinto (1993), em que o formocresol era aplicado em uma consulta e retirado dois a quatro dias depois, nos casos de suspeita de polpa em fase avançada de inflamação e mostrando sinais de resposta desfavorável. Tal medida era fundamentada na crença de que as camadas de fixação e inflamação são mais amplas de acordo com o tempo em que o medicamento fica em contato com a polpa. Entretanto, Matewson e Primosch, (1995), demonstraram que a duração da aplicação do formocresol não aumenta ou diminui a obtenção do sucesso da técnica.

Estudos realizados em animais tem questionado a segurança clínica do uso do formocresol, em virtude de apresentar potencial de toxicidade sistêmica, bem como, potencial mutagênico e carcinogênico possivelmente, pelo fato de existir em sua composição formaldeído (MYERS et al., 1978; MYERS et al., 1981; RANLY e HORN, 1987). Os efeitos descritos nesses estudos foram, no entanto, conseqüentes às grandes concentrações do formocresol empregadas, as quais estavam acima das que são preconizadas em pulpotomias de dentes decíduos (PASHLEY et al., 1980; MYERS et al., 1981; RANLY, 1985).

A partir de 1975, Han e colaboradores sugeriram utilizar o formocresol diluído a uma proporção de 1:5, o que já havia sido preconizado por Loos et al. (1973), seguindo as seguintes especificações: três partes de glicerina; uma parte de água destilada e uma parte do formocresol concentrado. De acordo com estes autores, o formocresol diluído apresenta vantagens de uma rápida recuperação da atividade

enzimática e da atividade celular, um menor efeito de fixação e uma zona de inflamação menos extensa (STRAFFON e HAN, 1968), efeitos esses também reconhecidos por Garcia-Godoy (1981). Assim, devido a possível absorção sistêmica do formocresol, a partir dos locais das pulpotomias e das subseqüentes reações tóxicas, julgou-se prudente adotar a fórmula de Buckley numa proporção de 1:5 (CAMERON e WIDMER, 1997).

Para um melhor entendimento do efeito sistêmico das diversas concentrações do formocresol, inclusive o comercializado, os pesquisadores Straffon e Han (1968) estudaram a diluição 1:50 em esponjas implantadas em animais, e verificaram que o formocresol nessa concentração não interfere com a recuperação prolongada do tecido conjuntivo e que suprime significativamente a resposta inflamatória inicial.

Assim, em 2002 King e colaboradores, realizaram estudo para avaliar a concentração de formocresol utilizada pelos dentistas pediátricos em pulpotomias de dentes decíduos. Eles verificaram que, a maioria dos odontopediatras utilizava a concentração total da formulação, apesar da maioria dos protocolos pediátricos recomendarem a diluição 1:5 de Buckley.

1.4 Toxicidade pré-Clínica do Formocresol: Formaldeído

A literatura vem descrevendo os efeitos toxicológicos do formaldeído e seu extenso potencial em desenvolver hepatotoxicidade, além do potencial alergênico, tanto pela inalação, quanto após exposição prolongada, decorrentes dos seus efeitos agudos, já bem documentada (MYERS et al., 1978; PASHLEY et al., 1980; SWENBERG et al., 1980; MYERS et al., 1981; MYERS et al., 1983; BEALL e ULSAMER, 1984; RANLY e HORN, 1987).

O formocresol aplicado em tecidos de polpas vitais é absorvido pelo sistema circulatório e distribuído pelo corpo. Essa fração do formocresol absorvida é metabolizada e excretada pelos rins e pulmões; o restante é armazenado no fígado, rim e pulmão. As conseqüências desse armazenamento são traduzidas em diversas alterações teciduais nestes órgãos, comprometendo também o sistema

cardiovascular conforme descrito por diversos autores (MYERS et al., 1978; PASHLEY et al., 1980; MYERS et al., 1981).

A toxicidade de altas doses do formocresol quando administrado por via sistêmica em cães, foi avaliada por Myers et al. (1981). Os autores observaram alterações cardiovasculares, como arritmias transitórias, diminuição da pressão sanguínea e da frequência dos batimentos cardíacos, hematúria, bem como elevação das enzimas desidrogenase láctica (LDL), transaminase oxalato glutâmico (TGO) e fosfatase alcalina (AP). Foram também, evidenciadas alterações histológicas no rim, do tipo edema glomerular, e grande aumento e mudança hidrópica do epitélio tubular. Nos pulmões foram observadas alterações sugestivas de pneumonia atípica, com infiltrado agudo e crônico de células inflamatórias, além de deposição de fibrina adjacente aos septos capilares.

As mudanças teciduais induzidas no fígado e rim conseqüentes à absorção do formocresol a partir de dezesseis sítios de pulpotomias realizadas em cães, foram também descritas por Myers et al. (1983). No tecido renal foi observada diminuição da largura do complexo de Bowman, decorrente de edema do ramo glomerular. Enquanto, no fígado, a falta de aparência sinusóide sugeriu um edema celular. A persistência dessas alterações não foram, contudo, avaliadas, existindo, portanto, a necessidade de estudos longitudinais para avaliar a ocorrência, ou não, de reversibilidade dos danos celulares em rim e fígado anteriormente descritos (RANLY e HORN, 1987).

Vale ressaltar, também, a necessidade de estudos que avaliem a absorção sistêmica do formaldeído em fase de vapor em pacientes e dentistas expostos nos consultórios odontológicos, vez que esses indivíduos têm uma exposição ambiental adicional àquela decorrente da fumaça do tabaco e da exaustão automotiva, o que pode acrescer o risco de doenças pulmonares (HECK et al., 1990).

1.5 Mutagenicidade e Carcinogenicidade do Formocresol

O potencial carcinogênico do formocresol foi avaliado por Salles et al. (1994) em hamsters. Os autores utilizaram a droga na diluição de 1:5, aplicando-a três vezes por semana na borda lateral da língua, com ou sem escarificação prévia, em trinta animais. Não foi observada transformação maligna em nenhum animal exposto, mas encontraram alterações epiteliais hiperplásicas nas áreas de aplicação descritas. Esses estudos não são portanto conclusivos, já que desde de 1946 Rapoport identificou o formaldeído como possuidor de potencial mutagênico através de estudos realizado em *Drosophila melanogaster*. Neste estudo, foram coletados ovos e larvas jovens expondo-os, através do alimento, a doses sub-letais de formaldeído. O formaldeído foi eficaz na indução de mutações letais ligadas ao cromossomo X. Posteriormente, Alderson (1964) concluiu que a atividade mutagênica do formaldeído é mediada pela reação de monohidroximetilação do formaldeído com o ácido adenílico. Tal reação é necessária e suficiente para expressão dos efeitos mutagênicos do formaldeído. A partir destes estudos, vários outros, utilizando diferentes organismos, vêm sendo realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos através dos quais o formaldeído exerce seu efeito mutagênico. Tem sido sugerido que ao interagir com o DNA, localmente desnaturado, o formaldeído induz a formação de dímeros de adenina, através de pontes de metileno. O formaldeído possui também a capacidade de inibir a enzima catalase, aumentando, assim, de modo indireto a taxa de mutações, vez que na ausência desta enzima formam-se radicais eletrofílicos que são altamente reativos com o DNA (AUERBACH et al., 1977).

Os efeitos genotóxicos do formaldeído têm sido avaliados em indivíduos ocupacionalmente expostos, como anatomistas, embalsamadores, patologistas, outros trabalhadores das áreas de saúde e indústria que manipulam e/ou produzem o formaldeído. Suruda et al. (1993), por exemplo, analisaram a ocorrência de micronúcleos em linfócitos e em células esfoliadas das mucosas bucal e nasal, obtidas de estudantes de ciências mortuárias, matriculados na disciplina de Embalsamamento, expostos, portanto, ao formaldeído. Os autores observaram ocorrência significativamente maior de micronúcleos em todos os tipos celulares

avaliados. É importante destacar que os riscos de desenvolvimento de câncer nos grupos de indivíduos sob exposição ocupacional ao formaldeído têm sido avaliados e os resultados obtidos mostram que tais populações estão sob risco significativamente maior de desenvolvimento de câncer de cérebro, nasofaríngeo e leucemias quando comparados com grupos não expostos (BLAIR et al., 1986; BLAIR e STEWART, 1990; BLAIR et al., 1990; STEWART e BLAIR, 1994; FIGGS et al., 1998; HILDESHEIM et al., 2001; HAUPTMANN et al., 2003).

O potencial carcinogênico do formaldeído foi também avaliado por diversos pesquisadores utilizando modelos animais e estudos *in vitro* (MULLER et al., 1978; SWENBERG et al., 1980; GOLDMACHER e THILLY, 1983; GRAFSTROM et al., 1993; SALES et al., 1994; MERK e SPEIT, 1998; HIDALGO et al., 1999; SOFFRITTI et al., 2002; HESTER et al., 2003). Entre esses estudos, o de Soffritti et al. (2002), revelou os efeitos carcinogênicos do formaldeído em vários órgãos e tecidos. Estes autores administraram o formaldeído diluído em água, com diferentes concentrações, administradas via oral, e detectaram tumores mamários malignos, lesões oncológicas no estômago e intestino, adenoma testicular e neoplasias hemolinforeticulares. Enquanto, o estudo de Muller et al. (1978), demonstrou o aparecimento de leucoplasias e lesões semelhantes a carcinomas *in situ*, após aplicação tópica crônica em mucosa oral de coelho.

De acordo com o modelo clássico da carcinogênese química, o processo de transformação maligna envolve três eventos: a iniciação, a promoção e a progressão. O processo de iniciação está relacionado à ocorrência de mutações que conferem à célula o potencial de crescer indefinidamente em cultura. Os agentes que iniciam, portanto, o processo maligno, são considerados genotóxicos. Os agentes promotores não são necessariamente genotóxicos, mas causam toxicidade e proliferação regenerativa com efeitos promocionais à carcinogênese. O formaldeído tem sido apontado como efetivo iniciador e discreto promotor (SQUIRE e CAMERON, 1994), e, assim, seu uso na prática clínica odontológica, necessita ser revisto, fato para o qual desde 1987 Juddy e Kenny chamam a atenção (JUDD e KENNY 1987; KENNY e JUDD, 1987).

1.6 Testes de Avaliação de Genotoxicidade

A avaliação do dano que pode ocorrer no DNA a nível cromossômico é parte importante da genética toxicológica, visto que as alterações cromossômicas são um evento importante no processo da carcinogênese. Embora o conhecimento da estrutura dos cromossomos seja, ainda, incompleto, várias evidências sugerem que as alterações cromossômicas sejam conseqüências e manifestações diretas de dano ao nível do DNA. Como por exemplo, quebras cromossômicas que podem resultar na falha do reparo da quebra na dupla cadeia do DNA.

Assim, uma maneira de se estudar os efeitos do potencial genotóxico de um dado composto é conduzindo os ensaios nas inúmeras técnicas que detectam danos ao DNA (TICE et al., 2000). Esses ensaios identificam o potencial carcinogênico do composto estudado. Dentre os ensaios empregados temos o Teste de Micronúcleo o qual é um método preferencial para medir o dano cromossômico, pois pode detectar tanto perda como quebra cromossômica, visto que são biomarcadores que se manifestam a curto prazo, após exposição e sua freqüência se encontra elevada em tecidos expostos antes que qualquer sinal clínico seja evidente. Além desse, a análise do Teste Cometa é um método sensível e rápido, capaz de detecta as variedades de lesões que possam ocorrer no DNA em células individuais, cujo o dano pode ser medido diretamente, servindo como biomarcador.

1.6.1 Teste de Micronúcleo

Micronúcleos são estruturas cromatínicas, visíveis em células interfásicas, que têm origem a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que por não se ligarem ao fuso mitótico não são incluídos nos núcleos das células filhas quando da divisão celular. Os micronúcleos são tipicamente arredondados, medindo de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito (SCHMID, 1976; HEDDLE et al., 1983; RABELLO-GAY, 1991). O Teste de Micronúcleo é um ensaio rápido, eficaz, portanto, na detecção de danos cromossômicos induzidos por agentes clastogênicos ou por agentes que interferem na formação do fuso mitótico, os denominados agentes aneugênicos (SCHMID, 1975).

A utilização do Teste de Micronúcleo, para avaliação de danos citogenéticos, historicamente tem suas raízes nas décadas de 1930 e 1940, quando citogeneticistas pioneiros descreveram o potencial da radiação X na indução de micronúcleo. Entre estes citogeneticistas, destacam-se Carlson (1938) que descreveu a ocorrência destas estruturas em gafanhotos, Sax (1941) que analisou células de meristema de cebola, e Koller que, em 1943, descreveu os efeitos dessa radiação em grãos de pólen de *Tradescantia* (EVANS, 1997).

O primeiro estudo, no entanto, em que micronúcleos foram utilizados como quantificadores de danos genéticos conseqüentes à radiação (gama e de nêutrons) foi realizado em 1959 por Evans e colaboradores em células de coifa de *Vicia faba*.

A utilização da análise de micronúcleos em células da medula óssea de roedores teve início a partir de estudos pioneiros realizados na década de 1970 (MATTER e SCHMID, 1971; HEDDLE, 1973; SCHMID, 1973). O objetivo desses estudos era identificar parâmetros que poderiam servir como indicadores de danos citogenéticos em células da medula óssea *in vivo*. Desses estudos, os autores concluíram que a incidência de eritrócitos policromáticos (PCE) micronucleados é particularmente útil com um índice de danos citogenéticos na medula óssea *in vivo* (HEDDLE et al., 1983).

A utilização da análise de micronúcleos em células da medula óssea de roedores, para avaliação dos efeitos genotóxicos de mutágenos, teve, ainda, a contribuição de diversos pesquisadores, a exemplo de Smoliar (1969), Muller et al. (1972), Roberts e Sturroch (1973) e von Ledebur e Schmid (1973). O estudo de von Ledebur e Schmid (1973) tem particular importância histórica porque foi a metodologia proposta por estes autores que conduziu diretamente ao desenvolvimento do Teste de Micronúcleo em PCEs obtidos da medula óssea de roedores, tal como hoje é empregado (SCHMID, 1976).

Atualmente, o Teste de Micronúcleo tem duas grandes aplicações: 1) no biomonitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos; 2) na avaliação do potencial mutagênico de um dado composto.

Para o biomonitoramento de populações, emprega-se este teste em linfócitos de sangue periférico (PINCU et al., 1984) ou em células esfoliadas de epitélios (STICH e ROSIN, 1984), o que permite, respectivamente, avaliar danos genéticos de forma sistêmica ou em um local específico de exposição.

O uso do Teste de Micronúcleo para avaliação do potencial mutagênico de um dado composto, conforme proposto originalmente por Heddle (1973) e Schmid (1975), é realizado em eritrócitos jovens_ os chamados eritrócitos policromáticos _ obtidos da medula óssea do fêmur de camundongos (GIMMLER-LUZ et al., 1997). Este teste se fundamenta no fato de que durante o processo de maturação dos eritroblastos, que resulta na formação dos eritrócitos, o núcleo é expulso da célula, de modo que, na ausência de eventos clastogênicos ou aneugênicos, nenhum material cromatínico está presente. Ao contrário do núcleo principal, micronúcleos não são expulsos durante o processo de maturação dos eritroblastos e, assim, na presença de agentes que induzam danos cromossômicos, sua presença pode ser detectada e computada em eritrócitos jovens, onde são facilmente reconhecidos.

Na análise do Teste de Micronúcleo em eritrócitos policromáticos, é importante ter em mente a dinâmica de maturação das células que vão originá-los. A primeira célula da linhagem eritroblástica, formada a partir da célula indiferenciada, é o pró-eritroblasto, que após 4 divisões dá origem aos eritroblastos. Estes sofrem uma única divisão e as células resultantes expulsam o núcleo diferenciando-se nos eritrócitos policromáticos, células, estas, ricas em RNA o que lhes confere a cor azul nas preparações feitas com o corante de Leishman (eosina-azul de metileno) (RABELLO-GAY, 1991; LORENZI, 1992; RIBEIRO, 2003). Durante um período de 10 a 24h os eritrócitos são jovens (eritrócitos policromáticos), de modo que a análise da ocorrência de micronúcleos apenas nesse tipo de célula indica que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Assim, a contagem de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos deve ser feita após 10 e até 24h, uma vez que após este período o RNA é metabolizado dando origem aos eritrócitos normocromáticos (RABELLO-GAY, 1991).

O Teste de Micronúcleo em eritrócitos de camundongos é amplamente usado por ser um teste simples, informando com eficiência danos ocorrendo no sistema hematopoiético (MORITA et al., 1997). Quando o sistema alvo de um dado agente não é o sistema hematopoiético, obviamente não será detectada indução de micronúcleos através da utilização desse teste.

O largo emprego do Teste de Micronúcleo, se deve às vantagens que apresenta sobre as técnicas clássicas de análise citogenética. Tais sejam:

- Micronúcleos podem ser observados em células de interfase, dispensando procedimentos de cultura;
- O Teste é realizado com baixo custo;
- A análise é de fácil realização uma vez que micronúcleos são facilmente reconhecidos, excluindo-se portanto erros de interpretação;
- O teste detecta a ação de agentes aneugênicos e clastogênicos;
- Este teste apresenta, contudo, algumas limitações. A saber:
- Micronúcleos somente são observados em células que passaram por uma divisão;
- Eventos de não-disjunção mitótica não são detectados;
- Aberrações que promovem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentos acêntricos, tais como translocações ou inversões, não são detectadas;
- Somente com a frequência de micronúcleos, é difícil distinguir os efeitos clastogênicos daqueles que resultam da perda cromossômica por lesão do fuso.

Publicações recentes chamam a atenção para o valor do Teste de Micronúcleo como um sistema rápido e barato de seleção de agentes com potencial para indução de danos genéticos. A confiabilidade deste teste na identificação deste potencial foi gerada a partir de inúmeros estudos cujos resultados apontaram para sua eficácia como indicador de danos cromossômicos. Assim, este teste é recomendado como parte do arsenal de testes regulares adotados na prática da Genética Toxicológica, aceito pelas instituições governamentais e pelas agências

internacionais de registros de novas drogas, drogas estas que são lançadas anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001).

1.6.2 Teste Cometa

O Teste Cometa é freqüentemente usado para mensurar danos no DNA das células individuais. Este teste não é utilizado para detectar mutações, mas lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferentemente dos testes de mutagenicidade, o teste cometa detecta lesões que são passíveis de correção. O Teste Cometa baseia-se no comportamento do DNA na célula, no que diz respeito a sua organização dentro do núcleo. Por ser compacto o DNA, após seu enovelamento com proteínas histônicas, forma alças aderidas a uma rede protéica ou “matriz nuclear”. Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, designada “nucleóide”, considerado este, como uma série de alças supernovelada de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual (GONTIJO, 2003). O cometa obtido depois da eletroforese, parece consistir de laços de DNA no qual são estruturas ligadas ao núcleo (KLAUDE et al., 1996).

Usando as vantagens do *fluorescent halo assay*, Ostling e Johanson (1984), desenvolveram um método baseado, no fato de que, células individualizadas, embebidas em agarose e posteriormente lisadas, eram expostas a uma “microeletroforese” que fazia com que o DNA migrasse para o ânodo devido a sua carga negativa. Assim alças relaxadas e/ou DNA danificado migrariam para além do nucleóide, método chamado de microgel (OSTLING e JOHANSON, 1987). A técnica foi modificada por Sing et al. (1988) que usava eletroforese alcalina para analisar mudanças DNA após tratamento com raio X ou H₂O₂. A aparência de cada nucleóide, semelhante a um cometa, quando submetido à eletroforese, ou seja, com seu DNA danificado levou Olive (1989) a sugerir o nome *comet assay* (teste cometa). Sing et al. (1988) e Olive et al. (1990) introduziram, independente e

paralelamente, algumas modificações no protocolo do teste cometa, as quais incluíam digestão protéica mais completa e a alcalinização da solução de lise e de eletroforese, essas modificações possibilitaram a identificação de quebras de fita simples, sítios álcalis lábeis e *crosslinks* no DNA, além das quebras de dupla-fita, já visualizada com o protocolo de Ostling e Johanson (1984; 1987) (GONTIJO, 2003).

O Teste Cometa, atualmente é considerado como sendo um teste de técnica rápida e sensível em detectar a presença de danos ao DNA, que pode ser aplicado a uma ampla variedade de órgãos, desde que se possa obter material viável para a realização do teste (MIYAMAE et al., 1998). Quando se utiliza linfócitos humanos, é um teste particularmente útil para detectar *in vitro*, as ações genotóxica de drogas e realizar estudos de biomonitoramento humano. De fato, o número de investigações, a compostos suspeitos de genotoxicidade, usando essa técnica tem crescido quase exponencialmente (TICE et al., 2000).

Tice et al. (2000), comparando o Teste Cometa, com outros testes de genotoxicidade, listou as seguintes vantagens dessa técnica:

- Demonstra sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA;
- Requer pequeno número de células por amostra;
- Flexibilidade;
- Baixo custo;
- Facilidade de aplicação;
- Habilidade para conduzir os estudos usando relativamente pequena quantidade da substância teste;
- Relativamente pequeno período de tempo (poucos dias) necessário para completar o experimento.

Durante a última década, o Teste Cometa tem sido utilizado basicamente como ferramenta para as pesquisa humanas e para investigações de biomonitoramento ambiental nos processos de reparo do DNA na genética toxicológica. Considerado como um teste atrativo devido ser potencialmente completo; poder ser utilizado como método para distinguir entre genotoxicidade e

citotoxicidade induzidas por danos cromossomais; e atualmente identificado como parte da bateria de testes *in vivo/in vitro* usado para considerações regulatórias.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial genotóxico do formocresol, através do Teste de Micronúcleo *in vivo* e pela análise do Teste Cometa *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do formocresol pelo método *Up-and-Down*;
- Analisar a ocorrência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos expostos por via intraperitoneal as diluições do formocresol;
- Analisar as alterações histomorfológicas do fígado, após 24h de tratamento;
- Investigar, através do Teste Cometa em linfócitos humanos em cultura, a indução de danos no DNA, após exposição *in vitro* ao formocresol.

3 METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

3.1.1 Toxicidade Aguda

- Formocresol (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda.);
- Glicerina bi-destilada (Amazonas);
- Seringas descartáveis 1 mL

3.1.2 Teste de Micronúcleo em Eritrócitos Policromáticos de Medula Óssea de Camundongos

3.1.2.1 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- Balança para pesagem de animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA);
- Base emborrachada para permanência do animal;
- Béqueres (SIMAX);
- Centrífuga (FANEM);
- Cubas;
- Caixas para guardar lâminas;
- Estante suporte para tubos de centrífuga;
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, etc.);
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME);
- Pipeta de Pasteur com pipetador de borracha;
- Seringas descartáveis 1 mL;
- Seringas descartáveis de 5 mL e agulhas de 25 x 7;
- Tubos de ensaio de vidro (PIREX);
- Tubos para centrífuga 15 mL (Laborglas);
- Lápis diamante.

3.1.2.2 Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes

- Água destilada;
- Ciclofosfamida (Genuxal 1000 mg, ASTA MÉDICA);
- Formocresol (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda.);
- Glicerina bi-destilada (Amazonas);

- Soro Fetal Bovino (CULTILAB);
- Solução de Leishman ® (MERCK);
- Entellan ® (MERCK).

3.1.3 Análise Histopatológica Hepática

- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME);
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, etc.);
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Solução de formol 10%;
- Corante hematoxilina-eosina.

3.1.4 Teste Cometa em Linfócitos Humanos *in vitro*

3.1.4.1 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- Centrífuga (FANEM);
- Cuba;
- Câmara umidificada;
- Estufa (FANEM);
- Geladeira e *freezer*;
- Garrote;
- Lâminas e lamínula;
- Microscópio de fluorescência (OLYMPUS);
- Seringas descartáveis 10 mL e agulhas 25 x 7;
- Tubo falcon;
- Tubos eppendorff-1,5 mL (GIBCO).

3.1.4.2 Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes

- Água destilada;
- Álcool 90%;
- Agarose 1,5% (USO);
- Agarose 0,5% LMP;
- Azul de Tripán;
- DMSO 5%;
- Etanol 100%;

- Formocresol (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda.);
- Gelo;
- Histopaque (SIGMA);
- PBS (Salina Fosfato Tamponada);
- Solução de EDTA;
- Solução de NaOH;
- Solução Tampão de Neutralização;
- Solução de Lise (USO);
- Solução de Eletroforese;
- Solução de Brometo de Etídio (GIBCO).

3.2 Método

3.2.1 Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade foi realizado em uma etapa preliminar, como triagem toxicológica inicial, objetivando determinar a diluição da droga teste compatível com a sobrevivência de pelo menos 50% dos animais (DEPASS, 1989). As alterações no comportamentais dos animais foram registradas durante as 48h de observação determinando o número de animais mortos. Foram utilizados grupos de 10 animais, para cada diluição teste, que incluiu formocresol puro (formulação comercialmente vendida), e diluições seguidas de 1:10; 1:50, além do grupo controle utilizando o veículo, glicerina bi-destilada. Administração intraperitoneal, 0,1mL/10 g peso.

3.2.2 Teste de Micronúcleo

3.2.2.1 Animais e Ambiente de Experimentação

Os animais utilizados neste estudo, camundongos machos Swiss, com 6 a 8 semanas de idade (MATTER e SHIMID, 1971; HEDLLE et al., 1983; RABELLO-GAY, 1991), foram oriundos e mantidos no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas (5/gaiola), forradas com maravalha autoclavada, em ambiente controlado com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade em torno de 60%, ciclo de luz 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração sem restrição (MACGREGOR et al., 1987).

3.2.2.2 Grupos Amostrais

O estudo incluiu seis grupos de animais (camundongos machos), subdivididos em dois subgrupos Subgrupo A e Subgrupo B, de acordo com o tempo de sacrifício pós-tratamento. Todos os animais foram pesados, marcados e divididos aleatoriamente (FIGURA 1) (ANEXOS 2 e 3) e distribuídos de acordo com o tratamento, que foram submetidos. Divisão dos grupos:

1) Grupo de Diluição Formocresol 1:50

Subgrupo A₁ composto de 10 animais, sacrificados 24h pós-tratamento;

Subgrupo B₁ composto de 10 animais, sacrificados 48h pós-tratamento.

2) Grupo de Diluição Formocresol 1:100

Subgrupo A₂ composto de 10 animais, sacrificados 24h pós-tratamento;

Subgrupo B₂ composto de 10 animais, sacrificados 48h pós-tratamento.

3) Grupo de Diluição Formocresol 1:500

Subgrupo A₃ composto de 10 animais, sacrificados 24h pós-tratamento;

Subgrupo B₃ composto de 10 animais, sacrificados 48h pós-tratamento.

4) Grupo de Diluição formocresol 1:1000

Subgrupo A₄ composto de 10 animais, sacrificados 24h pós-tratamento;

Subgrupo B₄ composto de 10 animais, sacrificados 48h pós-tratamento.

Em todos os subgrupos tratados com o formocresol, a administração foi realizada por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g peso) (FIGURA 2).

5) Grupo Controle Positivo

Subgrupo A₅ composto de 10 animais, sacrificados 24h pós-tratamento com ciclofosfamida na dose de 20 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g peso),

Subgrupo B₅ composto de 10 animais, sacrificados 48h pós-tratamento com ciclofosfamida na dose de 20 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g peso).

6) Grupo Controle Negativo

Subgrupo A₆ composto de 05 animais, sacrificados 24h pós-tratamento com glicerina bi-destilada, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g peso);

Subgrupo B₆ composto de 05 animais, sacrificados 48h pós-tratamento com glicerina bi-destilada, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g peso).

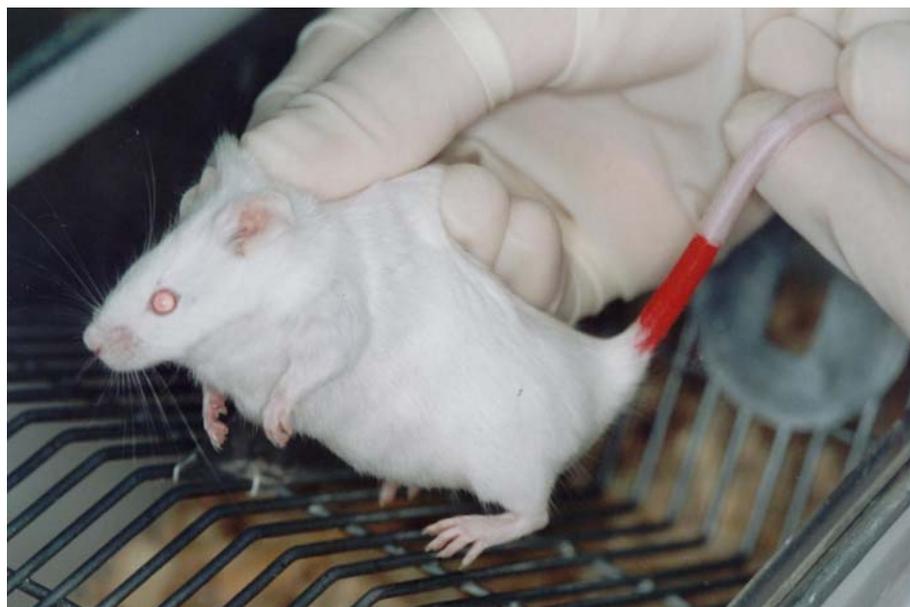


FIGURA 1. Identificação dos animais



FIGURA 2. Administração por via intraperitoneal das drogas testadas

3.2.2.3 Obtenção e Preparação do Material para Análise

Após o período determinado (24h e 48h), todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os fêmures foram retirados, limpos e as epífises proximais foram seccionadas. A medula óssea foi retirada fazendo uso de seringa 5 mL previamente preenchida com 0,5 mL de soro fetal bovino. Posteriormente, a agulha foi firmemente inserida na abertura do fêmur e o soro fetal bovino foi injetado de modo a deslocar a medula para dentro de um tubo de centrifuga contendo 3 mL de soro fetal bovino. Com uma pipeta de Pasteur o material foi homogenizado e, em seguida, centrifugado a uma rotação de 1000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado homogenizado com auxílio de uma pipeta Pasteur. Uma gota da suspensão de células foi transferida para lâmina limpa e seca sendo em seguida realizado, com auxílio de outra lâmina, o esfregaço. Foram preparadas duas lâminas para cada animal, correspondente aos subgrupos tratados. As lâminas secaram *overnight*. E após 24h, o material foi fixado e corado pelo método de Leishman. As lâminas foram montadas com entellan (SCHIMID, 1975). (FIGURAS 3 a 13).



FIGURA 3. Abertura da cavidade abdominal do camundongo para posterior remoção do fêmur

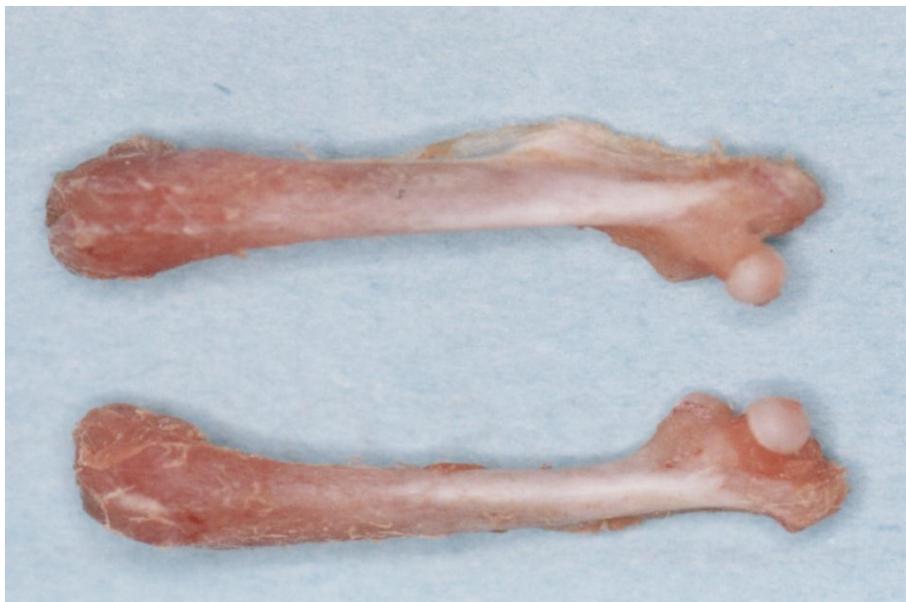


FIGURA 4. Fêmures dos camundongos após limpeza externa

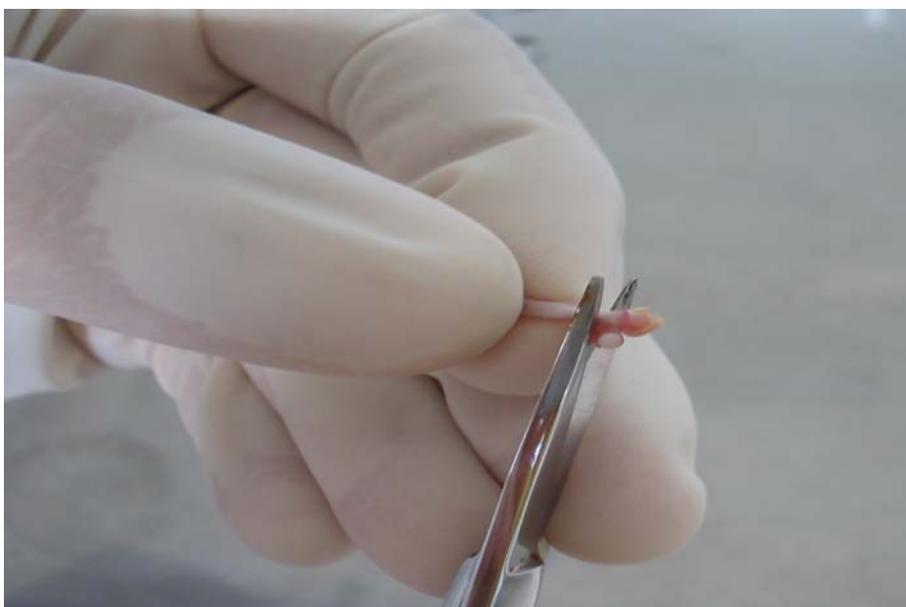


FIGURA 5. Corte da epífise proximal dos camundongos

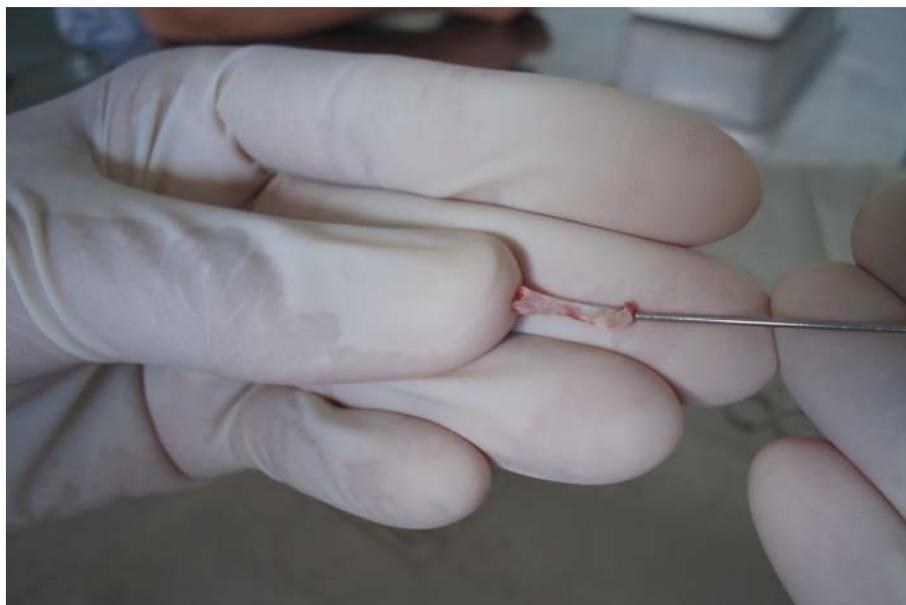


FIGURA 6. Agulha, introduzida no fêmur após corte da epífise proximal, conectada à seringa contendo 0,5 mL de soro fetal bovino



FIGURA 7. Fêmur submergido no tubo de centrifuga, com 3 mL de soro fetal bovino, para remoção da medula óssea

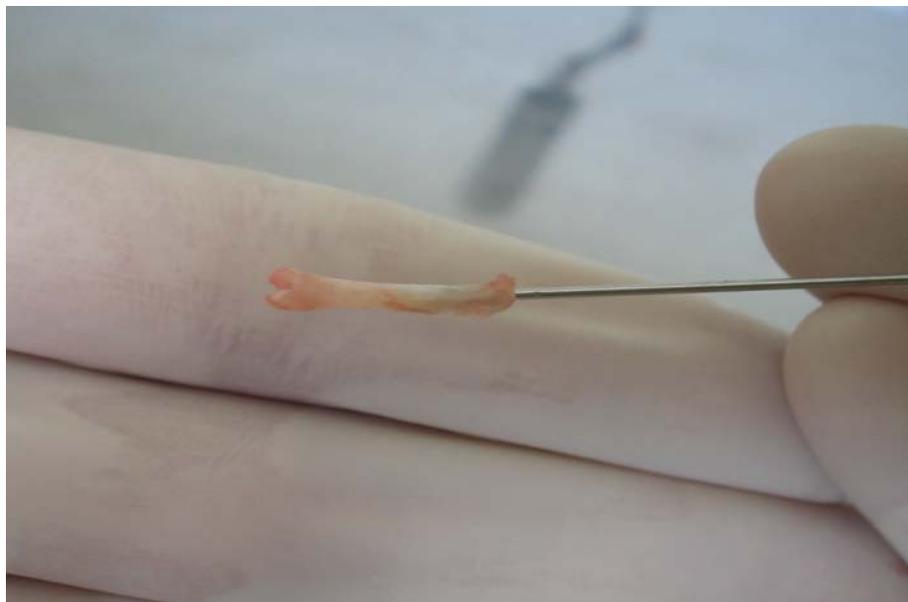


FIGURA 8. Aspecto do fêmur após retirada da medula óssea



FIGURA 9. Sedimentação dos linfócitos após centrifugação com soro fetal bovino



FIGURA 10. Sedimento ressuspensionado com o auxílio da pipeta Pasteur

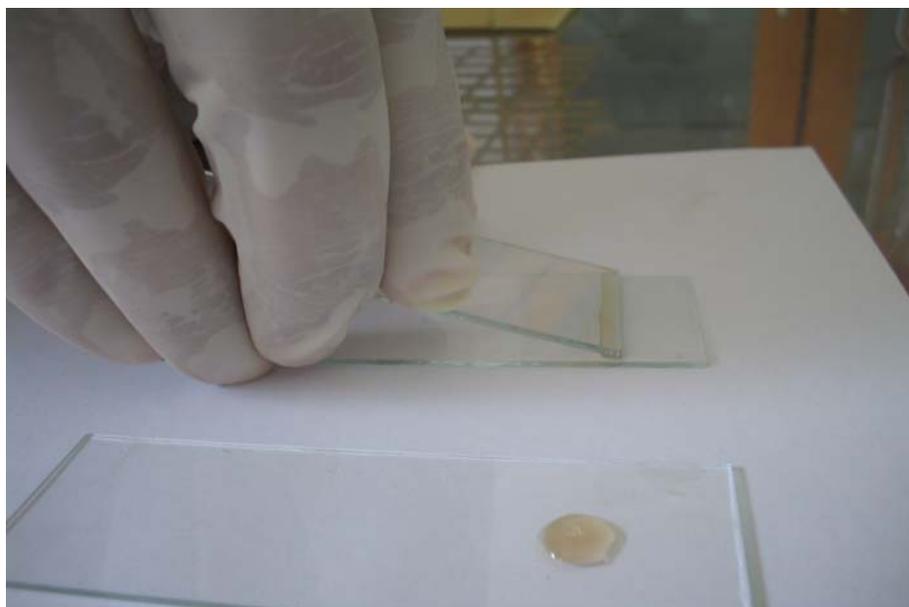


FIGURA 11. Confeção do esfregaço nas lâminas.

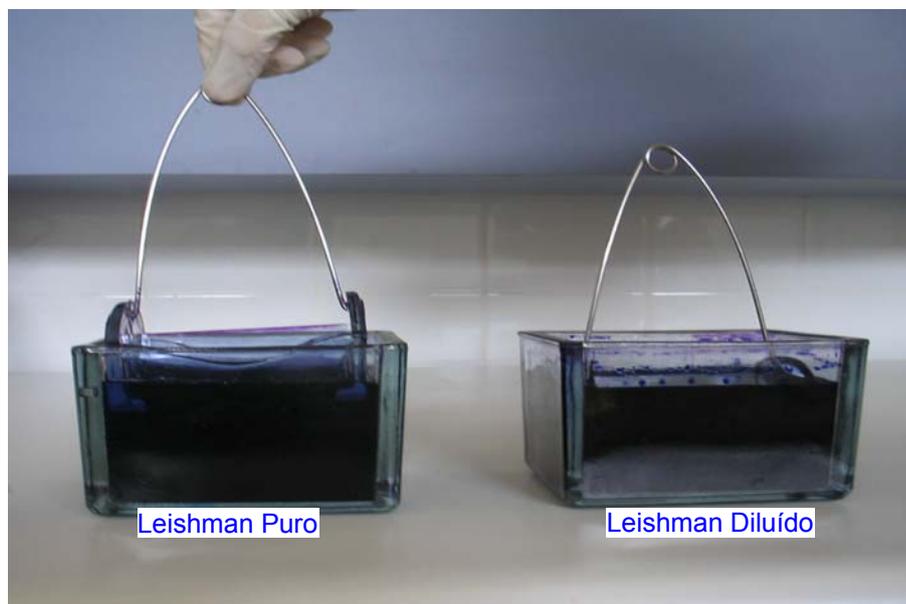


FIGURA 12. Coloração das lâminas com corante Leishman puro (permanência 3 mim) e diluído (permanência 15 mim)



FIGURA 13. Lâminas coradas e montadas com lamínulas, para posterior análise

3.2.2.4 Análise de Micronúcleo

Toda a análise foi realizada em teste cego, utilizando Microscópio óptico binocular, com objetivas 20X e 40X. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Schmid (1976) e Hedlle et al. (1983). Assim, foram considerados micronúcleos as estruturas tipicamente arredondadas, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro dos eritrócitos jovens identificados pela coloração azulada (RABELLO-GAY, 1991). Um total de 1000 eritrócitos policromáticos foi analisado, através da leitura de duas lâminas por animal (HEDDLE et al., 1983; RABELLO-GAY, 1991) (FIGURAS 14 a 16) (ANEXO 4).

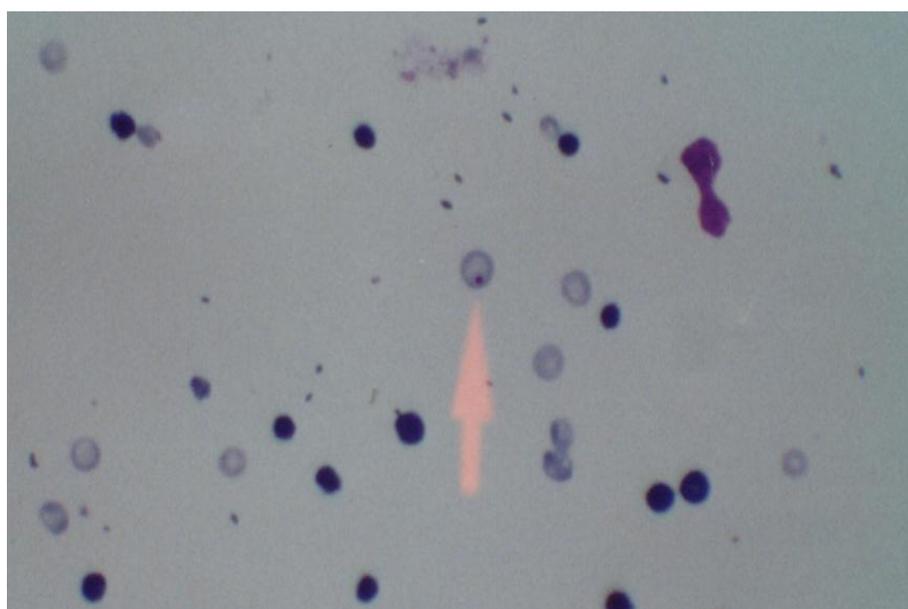


FIGURA 14. Fotomicrografia apresentando Eritrócito Policromático (PCE) micronucleado (HE 40X)

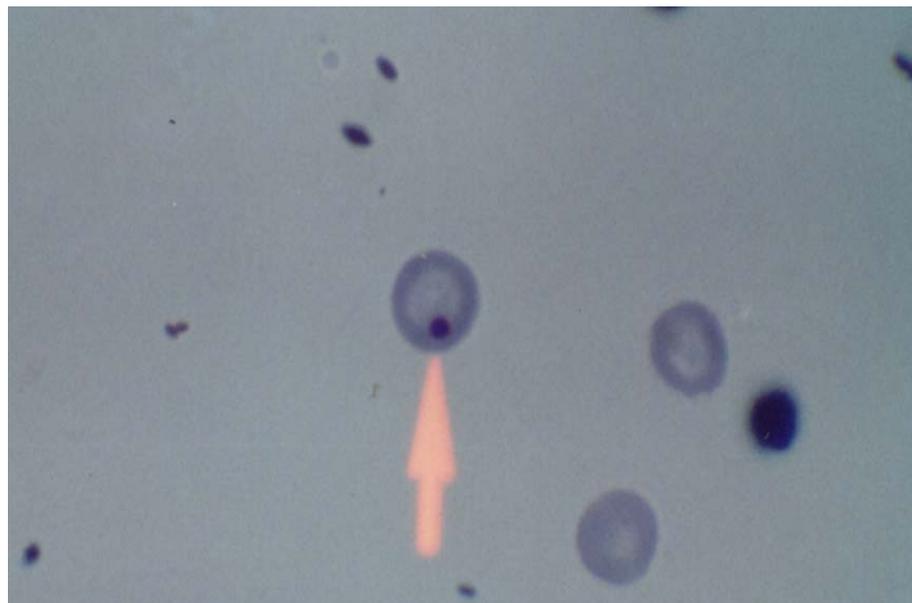


FIGURA 15. Fotomicrografia identificando Eritrócito Policromático (PCE) micronucleado (HE 100X)

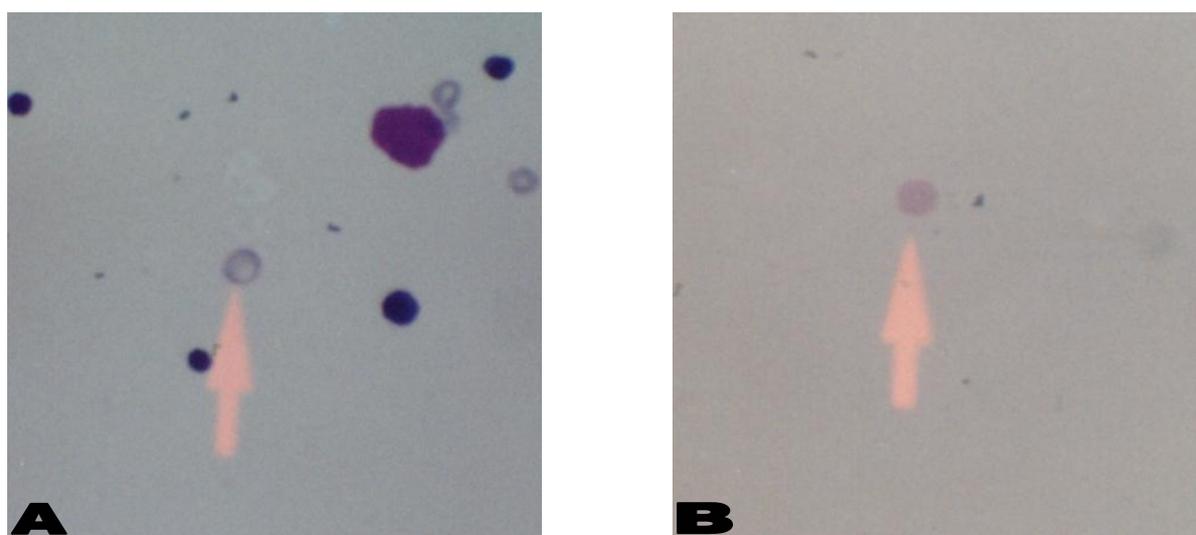


FIGURA 16. Fotomicrografia de esfregaço de células da medula óssea: A) Eritrócito Policromático (PCE); B) Eritrócito Normocromático (NCE) (HE 40X)

3.2.2.5 Análise Estatística

A análise estatística, referente a ocorrência de micronúcleo nos grupos controle e expostos às diferentes diluições do formocresol, foi feita com o uso do Teste Condicional para Comparação de Proporções em Situação de Eventos Raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991). Considerou-se que houve diferença entre os grupos tratados e os controles quando o valor de p foi menor ou igual a 0,001.

3.2.3 Análise Histopatológica

3.2.3.1 Obtenção, Preparo e Análise do Material

Após, retirada dos fêmures para estudo de micronúcleos, o fígado de quatro animal de cada grupo foi retirado e fixado em formol 10%. O material foi enviado para o Serviço de Biópsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina Patologia da Universidade Federal do Ceará, onde foi processado pela técnica de coloração de rotina com hematoxilina-eosina. A análise foi realizada sob microscopia óptica.

3.2.4 Teste Cometa

3.2.4.1 Seleção de Voluntários e Obtenção do Material para Análise

Para o estudo com linfócitos humanos, foi utilizado sangue periférico de quatro doadores voluntários, obedecendo aos seguintes critérios:

- ✓ Critérios de Inclusão:
 - Ter entre 18 e 25 anos;
 - Estar em bom estado clínico de saúde

- ✓ Critérios de Exclusão:
 - Ser etilista ou tabagista;
 - Estar fazendo uso de algum medicamento.

A coleta do material (sangue periférico retirado da veia cefálica, ou basílica) foi realizada por profissionais capacitados, nas dependências do UNIFAC, utilizando seringa esterilizada e descartável. O material assim obtido foi imediatamente transportado para o Laboratório de Oncologia Experimental (I e II) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC.

3.2.4.2 Procedimento

3.2.4.2.1 Isolamento e Manutenção dos Linfócitos

Os linfócitos foram isolados a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue, acrescida de 0,5 mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição

de 3 mL de histopaque ao sangue obtido, seguido, por 30 min de centrifugação a 1500 rpm. Foi realizada a aspiração dos linfócitos, presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro (“nuvem de linfócitos”) (FIGURA 17), seguida da transferência destes para tubo de ensaio, o qual foi acrescido PBS até o volume de 11 mL, e centrifugado por 20 min a 1000 rpm, após centrifugação retirou-se o sobrenadante. O material restante foi ressuspendido em 2 mL de PBS, e determinada a viabilidade celular pelo método do Azul de Tripán. As células foram, então expostas ao formocresol nas diluições de 1:750, 1:1000 e 1:2000, e incubadas por 45 min a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período de incubação iniciou-se a execução do Teste Cometa.

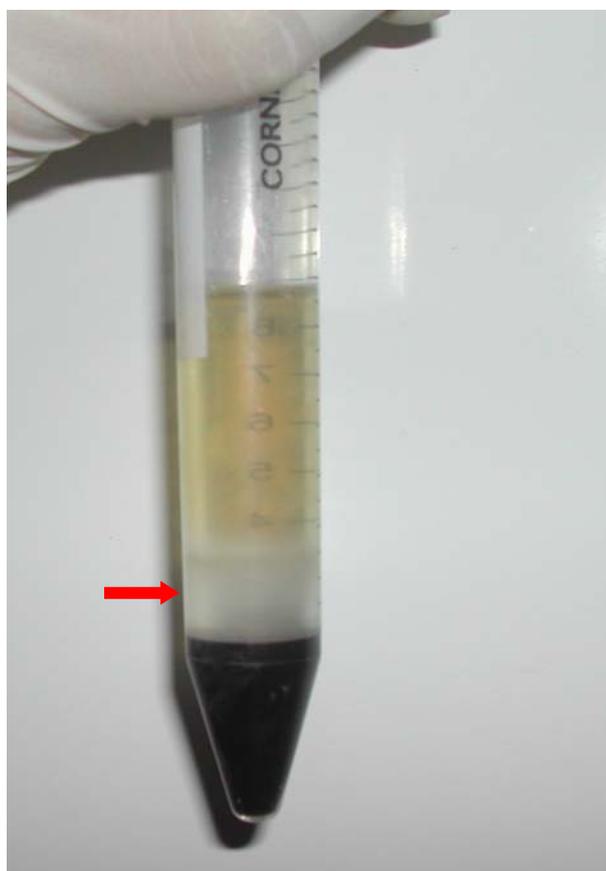


FIGURA 17. Isolamento dos linfócitos

3.2.4.2.2 Execução do Teste Cometa

a) Preparação das lâminas

O teste seguiu basicamente a metodologia descrita inicialmente por Sing et al. (1988) e modificada por Anderson et al. (1994). As lâminas foram previamente,

cobertas com 110 μ l de agarose de ponto de fusão normal a 0,5%, a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Sendo em seguida adicionados uma segunda camada composta de 110 μ L agarose 1,5% com 10 μ L de linfócitos tratados com as diluições do formocresol. Em seguida a lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose (FIGURA 18).



FIGURA 18. Apresentação das lâminas com camada de agarose

b) Lise Celular

Após solidificação da agarose a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine; a pH 10,0; 1% Triton X 100; 10% DMSO), protegida da luz, em baixa temperatura (4°C) por num mínimo 1 hora (FIGURA 19).



FIGURA 19. Cuba com solução de Lise, protegida da luminosidade

c) Neutralização e Eletroforese

As lâminas, foram removidos da solução de lise, e neutralizadas por 15 min na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5). As lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com a solução de eletroforese a 4°C (1 mM Na² EDTA, 300 mM NaOH; pH > 13) até cobertura total (FIGURA 20). As lâminas repousaram por 20 mim para permitir o desenrolamento do DNA e a expressão do dano antes da eletroforese. A eletroforese foi conduzida a baixa temperatura inicialmente a 4°C por 20 min, usando 25 V e corrente de 300 mA. Todos esses passos foram conduzidos na presença de baixa luminosidade. Após eletroforese as lâminas, foram retiradas da cuba. E então mergulhadas numa solução tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) durante 5 mim, para neutralizar a alcalinidade.



FIGURA 20. Sistema de eletroforese

d) Coloração

Após, corrida em eletroforese as lâminas foram fixadas com etanol a 100%. Posteriormente, foi aplicado 30 μ L da solução de Brometo de Etídio e em seguida foram cobertas com lamínula. As lâminas, foram então transferidas para um câmara humidificada, a fim de prevenir o ressecamento do gel, e submetidas a análise dentro de 3-4 h.

e) Escore das Lâminas

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (FIGURA 21). Foram, contados 100 células/lâmina (LOVELL et al., 1999) e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, nas seguintes categorias de escores:

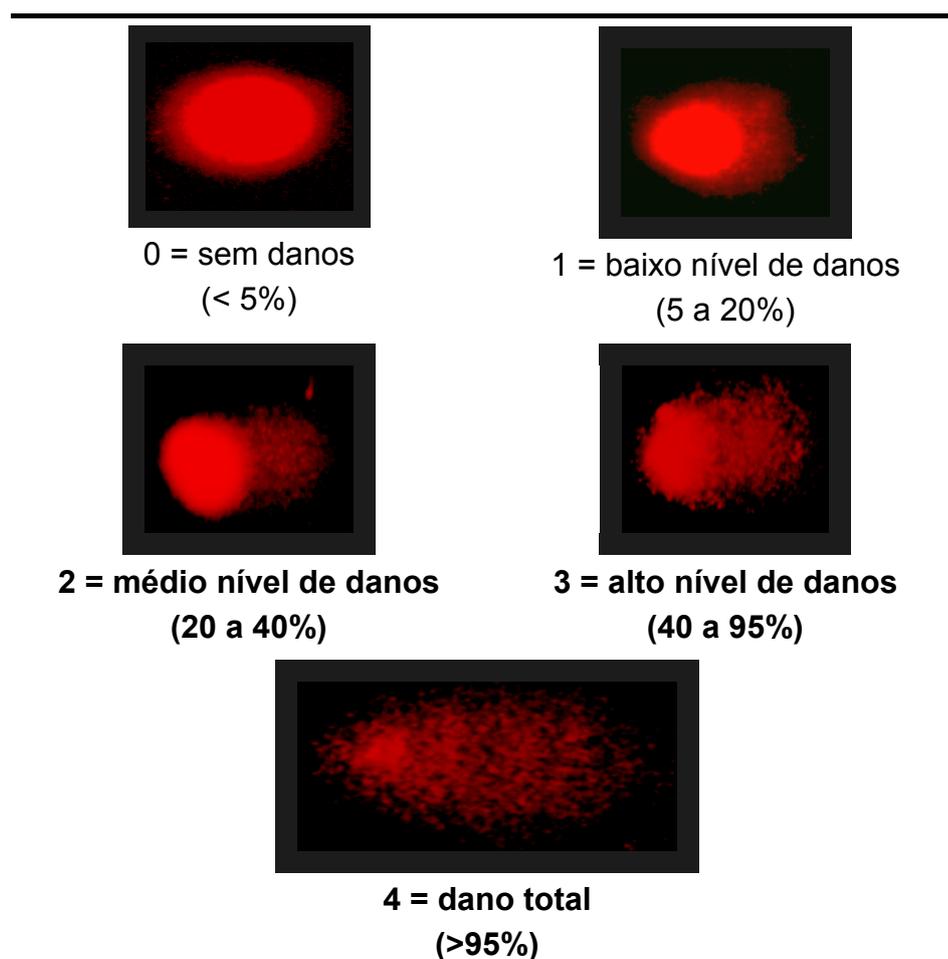


FIGURA 21. Padrão de escores

3.2.4.2.3 Análise Estatística

Para análise estatística dos experimentos foi utilizado o teste de Qui-quadrado. Foram considerados resultados significantes quando existiu diferença significativa entre os grupos tratados e controle, e quando o p foi menor ou igual a 0,01.

3.3 Aspectos Éticos da Pesquisa

3.3.1 Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos

A pesquisa, atendendo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96 (BRASIL, 1996), foi previamente apreciada por Comitê de Ética em Pesquisa (ANEXO 5) e realizada mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido pelos indivíduos que manifestaram anuência à participação no estudo (ANEXO 6).

O Estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edimburgo (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS-MS).

Todas as informações obtidas durante o estudo, referentes ao estado de saúde do voluntário estão disponível aos pesquisadores e aos médicos da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo é inerente à sua função.

3.3.2 Comitê de Ética em Pesquisa em Animais

A pesquisa com animais atendeu aos Princípios Éticos publicados pelo COBEA (Código Brasileiro de Experimentação Animal), foi previamente apreciada e aprovada pelo Comitê de Ética da Pesquisa em Animais. Todos os termos e exigências, assim como eventuais condições colocadas pela CEUA/UEFS, foram cumpridos (ANEXO 7).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Todos os animais expostos à substância pura ou na concentração 1:10 tiveram morte imediata, durante avaliação preliminar de toxicologia.

Após os períodos de 24h e 48h de observação pós-tratamento, constatou-se 11 mortes no grupo de 24h e 19 mortes no grupo de 48h sob diferentes concentrações do formocresol (1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000). A amostra exposta analisada foi, portanto, constituída por 50 animais, assim distribuídos: 29 animais, sacrificados no grupo de 24h e 21 animais no grupo de 48h. Nos grupos controle positivo e negativo sacrificados, após 24h não houve registro de morte entre os animais. No entanto, um animal morreu do grupo controle negativo 48h. A amostra total analisada foi de 79 animais. Dados apresentados no Gráfico 1 e Tabela 1.

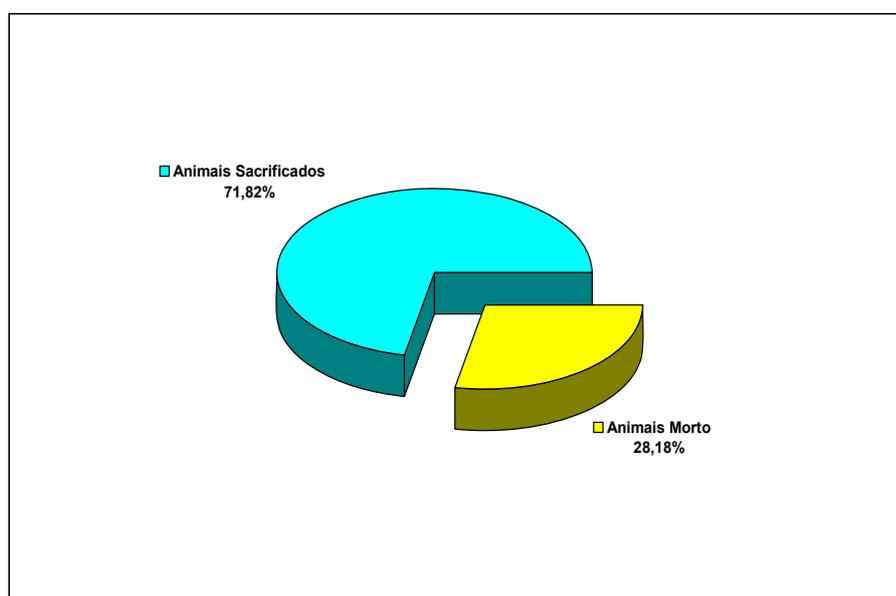


GRÁFICO 1. Proporção entre os animais mortos e animais sacrificados (analisados) para o período de 24h e 48h

TABELA 1. Avaliação da toxicidade por tempo de observação e concentração

Tempo de Avaliação	Concentração *	Número de animais		TOTAL
		que morreram	sacrificados	
24 horas	1:50	4	6	10
	1:100	3	7	10
	1:500	2	8	10
	1:1000	2	8	10
	Ciclofosfamida **	-	10	10
	Glicerina ***	-	5	5
Total com 24 horas		11 (20,0%)	44 (80,0%)	55 (100,0%)
48 horas	1:50	5	5	10
	1:100	5	5	10
	1:500	5	5	10
	1:1000	4	6	10
	Ciclofosfamida **	-	10	10
	Glicerina ***	1	4	5
Total com 48 horas		20 (36,4%)	35 (63,6%)	55 (100,0%)

*Todos 10 animais submetidos à substância pura tiveram morte imediata e todos 10 submetidos à dosagem na concentração de 1:10 morreram antes de 24h; **Controle positivo – Ciclofosfamida; ***Controle negativo – Glicerina Bi-distilada.

4.1 Avaliação da Toxicidade do Formocresol

Da análise da Tabela 1 é possível observar que o número de animais que morreram antes das 24h reduziu à medida que a concentração da dosagem diminuiu, sendo que este número variou de quatro animais na concentração de 1:50 para dois animais na concentração de 1:1000 na avaliação com 24h. No período de 48h a redução foi de cinco animais na concentração de 1:50 e de quatro animais na concentração de 1:1000. Independente da concentração do formocresol, o número de animais que morreram foi mais elevado na avaliação de 48h do que na avaliação com 24h [19 (34,54%) e 11 (20,0%) respectivamente].

A avaliação das diferenças entre as proporções totais de morte entre os animais dos grupos 24h e 48h (expostos ao formocresol, controle positivo e negativo) foi feita com o uso do teste de Qui-quadrado (χ^2). O resultado obtido não revelou diferença significativa: $\chi^2 = 3,64$; $p = 0,0565$; GL = 1.

Analisando, com o uso do mesmo teste (feita correção de Yates quando necessária), as diferenças entre as proporções de mortes, por cada grupo de

diluição, em função do tempo de sacrifício (24h e 48h), não foram também encontradas diferenças significantes. Os valores e probabilidades obtidos encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2. Valores de χ^2 e p obtidos na comparação das mortes em cada grupo de diluição em função do tempo de sacrifício

Diluição	χ^2	p	GL
1:50	0,00	1,0	1
1:100	0,21	0,648077	
1:500	0,88	0,348443	
1:1000	0,24	0,625585	

4.2 Análise de Micronúcleo (MN)

4.2.1 Ocorrência de Micronúcleos entre os Tempos de Sacrifício 24h e 48h

Um total de 79.000 eritrócitos policromáticos (PCEs) foi analisado. No grupo 24h foram analisados 44.000 PCEs e observados 195 micronúcleos. No grupo 48h, 35.000 eritrócitos policromáticos foram analisados e observados 219 micronúcleos. A análise estatística mostrou diferença significativa na ocorrência de micronúcleos entre os grupos 24h e 48h: $\chi^2 = 12,4137$; $p = 0,0004$; $GL = 1$ (TABELA 3).

TABELA 3. Análise da ocorrência de MN nos grupos em função do tempo de sacrifício

Tempo de Sacrifício	Nº de Eritrócitos Policromáticos analisados	Número de Micronúcleo Encontrados	Número de Micronúcleo Esperado	χ^2
24 horas	44.000	195	230,5823	$\chi^2 = 12,4137$ $p = 0,0004$
48 horas	35.000	219	183,4177	
TOTAL	79.000	414	414	GL = 1

4.2.2 Ocorrência de Micronúcleos nas Diluições do Formocresol, Controle Positivo e Negativo para os Animais Sacrificados com 24h

Um total de 44 animais foi sacrificado no período de 24h após administração do Formocresol nas diversas diluições, do controle positivo (ciclofosfamida) e do controle negativo (glicerina). Entre os 44.000 PCEs analisados foram observados

195 micronúcleos. O número de micronúcleos e o número de PCEs observados nos animais sacrificados são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Dados relativos à ocorrência de MN no grupo sacrifício 24h

Tratamento	Nº de animais sacrificados	Total de PCEs	Nº de micronúcleos
1:50	6	6.000	19
1:100	7	7.000	21
1:500	8	8.000	25
1:1000	8	8.000	50
CP	10	10.000	68
Glicerina	5	5.0000	12
Total	44	44.000	195

CP = Ciclofosfamida (Controle Positivo); Glicerina Bi-destilada (Controle Negativo)

A análise da diferença na ocorrência de MN entre os grupos aponta diferença significativa: $\chi^2 = 31,9655$; GL = 5; $p < 0,001$. Em relação a este resultado, as partições de qui-quadrado revelam que: 1) não há diferença na ocorrência de micronúcleos quando da comparação entre as diluições de 1:50 e 1:100 ($\chi^2 = 0,0393$; GL = 1; $p > 0,80$); 2) agrupando estas duas categorias, vez que são iguais, o número de micronúcleos observado também não difere do observado na diluição de 1:500 ($\chi^2 = 0,0037$; GL = 1; $p > 0,95$); 3) a comparação entre o número de micronúcleos observado nas três categorias agrupadas (1:50 + 1:100 + 1:500) e o número de micronúcleos observado na diluição de 1:1000, revela diferença significativa ($\chi^2 = 14,5394$; GL = 1; $p < 0,001$); 4) não há diferença na ocorrência de micronúcleos observada nas três menores diluições quando feita comparação com o controle negativo ($\chi^2 = 0,6592$; GL = 1; $p > 0,30$), mas; 5) o número de micronúcleos observado nestas diluições (1:50 + 1:100 + 1:500) é significativamente menor do que o induzido nos animais tratados com ciclofosfamida ($\chi^2 = 21,6715$; GL = 1; $p < 0,001$); a comparação feita entre o número de micronúcleos observado nos animais tratados com formocresol na diluição de 1:1000 é significativamente maior do que o observado no controle negativo ($\chi^2 = 9,5630$; GL = 1; $p < 0,01$) e não difere do número de micronúcleos observado no grupo controle positivo ($\chi^2 = 0,2135$; GL = 1; $p > 0,50$). Dados apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Comparação da ocorrência de MN no grupo sacrifício 24h

Grupos	Total de células	MN ob**	Partições χ^2
Formocresol diluído 1:50 (a)	6.000	19	(a)x(b)=0,0393; GL=1; p>0,80
Formocresol diluído 1:100 (b)	7.000	21	(a+b)x(c)=0,0037; GL=1; p>0,95
Formocresol diluído 1:500 (c)	8.000	25	(a+b+c)x(d)=14,5394; GL=1; p<0,001*
Formocresol diluído 1:1000 (d)	8.000	50	(a+b+c)x(e)=21,6715; GL=1; p<0,001*
Clicofosfamida (e)	10.000	68	(a+b+c)x(f)=0,6592; GL=1; p>0,30
Glicerina Bi-destilada (f)	5.000	12	(d)x(e)=0,2135; GL=1; p>0,50
Total	44.000	195	(d)x(f)=9,563; GL=1; p<0,01
			$\chi^2 = 31,9655$; GL = 5; p < 0,001

*Significante p < 0,001; **Micronúcleos observados

4.2.3. Ocorrência de Micronúcleos nas Diluições do Formocresol, Controle Positivo e Negativo para os Animais Sacrificados com 48h

Um total de 35 animais foi sacrificado no período de 48h após administração das diferentes diluições do Formocresol, controle positivo (ciclofosfamida) e controle negativo (glicerina). Entre os 35.000 PCEs analisados foram observados 219 micronúcleos. O número de micronúcleos e o número de PCEs observados nos animais sacrificados são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Dados relativos à ocorrência de MN no grupo sacrifício 48h

Tratamento	Nº de animais sacrificados	Total de PCEs	Nº de micronúcleos
1:50	5	5.000	27
1:100	5	5.000	19
1:500	5	5.000	19
1:1000	6	6.000	23
CP	10	10.000	118
Glicerina	4	4.000	13
Total	35	35.000	219

CP = Ciclofosfamida (Controle Positivo); Glicerina Bi-destilada (Controle Negativo)

A análise da diferença na ocorrência de MN entre os grupos aponta diferença significativa: $\chi^2 = 70,7516$; GL = 5; p < 0,001. Em relação a este resultado, as partições de qui-quadrado revelam que: 1) não há diferença na ocorrência de micronúcleos quando da comparação entre as diluições de 1:50 e 1:100 ($\chi^2 = 1,3914$; GL = 1; p > 0,20); 2) agrupando estas duas categorias, vez que são iguais, o número de micronúcleos observado também não difere do observado na diluição de

1:500 ($\chi^2 = 0,4923$; GL = 1; $p > 0,30$); 3) a comparação entre o número de micronúcleos observado nas três categorias agrupadas (1:50 + 1:100 + 1:500) e o número de micronúcleos observado na diluição de 1:1000, não revela diferença significativa ($\chi^2 = 0,2557$; GL = 1; $p > 0,50$); 4) não há diferença na ocorrência de micronúcleos observada nas quatro diluições quando feita comparação com o controle negativo ($\chi^2 = 0,9298$; GL = 1; $p > 0,30$), mas; 5) o número de micronúcleos observado nestas diluições (1:50 + 1:100 + 1:500 + 1:1000) é significativamente menor do que o induzido nos animais tratados com ciclofosfamida ($\chi^2 = 25,7984$; GL = 1; $p > 0,001$); Dados apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Comparação da ocorrência de MN no grupo sacrifício 48h

Grupos	Total de células	MN ob**	Partições χ^2
Formocresol diluído 1:50 (a)	5.000	27	(a)x(b)=1,3914; GL=1; $p>0,20$
Formocresol diluído 1:100 (b)	5.000	19	(a+b)x(c)=0,4923; GL=1; $p>0,30$
Formocresol diluído 1:500 (c)	5.000	19	(a+b+c)x(d)=0,2557; GL=1; $p>0,50$
Formocresol diluído 1:1000 (d)	6.000	23	(a+b+c+d)x(e)=25,7984; GL=1; $p<0,001^*$
Clicofosfamida (e)	10.000	118	(a+b+c+d)+(f)=0,9298; GL=1; $p>0,30$
Glicerina Bi-destilada (f)	4.000	13	
Total	35.000	219	$\chi^2 = 70,7516$; GL = 5; $p < 0,001$

*Significante $p < 0,001$; **Micronúcleos observados

4.3 Análise do Cometa

O Formocresol em todas as diluições usadas induziu a formação do *crosslinks*, não havendo a formação de cometa em nenhuma das diluições testadas (FIGURAS 22 e 23). Enquanto nas amostras utilizadas como controle positivo, com doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) verificamos que da média das 100 células contadas em 4 experimento, 20 apresentaram escore tipo 1; 51 escore tipo 2; 21 escore tipo 3 e 8 com escore tipo 4. Já, no controle negativo 80 apresentaram escore do tipo 0 e 20 apresentaram escore do tipo 1. Assim, nas análises realizadas entre o grupo controle positivo e negativo verificamos que houve uma diferença significativa entre os escores analisados ($\chi^2 = 232,7$; GL = 4; $p < 0,001$) (TABELA 8)

TABELA 8. Comparação na ocorrência de cometas e formação de *crosslinks*

EscORES (x)						Total	<i>Crosslinks</i>
	0	1	2	3	4		
Grupos							
Diluição 1:750	-	-	-	-	-	-	+
Diluição 1:1000	-	-	-	-	-	-	+
Diluição 1:2000	-	-	-	-	-	-	+
Controlo Positivo*	-	20	51	21	8	100	-
Controlo Negativo**	80	20	-	-	-	100	-
							$\chi^2 = 237,7$; GL = 4; p < 0,001

*Controlo Positivo (Doxorrubicina 0,3 µg/mL); **Controlo Negativo (Álcool 5%)

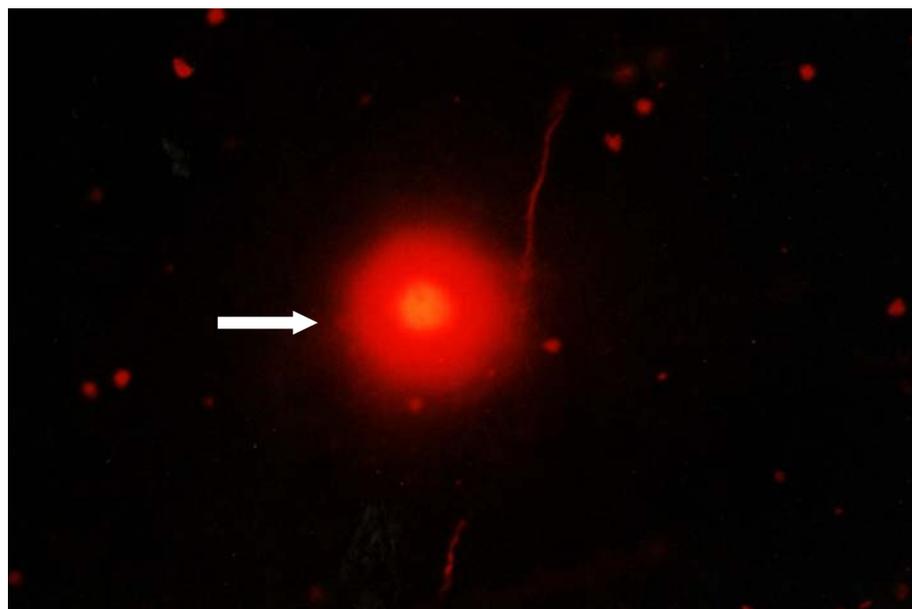


FIGURA 22. Fotomicrografia de célula em *crosslinks*, após teste com diluições do formocresol (HE 40X)



FIGURA 23. Fotomicrografia de um campo com células em *crosslinks*, após teste com diluições do formocresol (HE 40X)

4.4 Análise Histológica do Fígado.

Nas análises histológicas dos fígados os animais do grupo controle negativo, apresentaram presença de leve tumefação turva, dilatação da veia centrolobular e congestão portal (FIGURAS 24 e 25). Essas duas últimas alterações, foram também identificadas nos animais tratados com as diluições de 1:500 e 1:1000 (FIGURA 26), além da identificação da presença de hemorragia sinusoidal nas duas diluições acima. Na diluição de 1:500 foi verificado, ainda, a presença de foco inflamatório e hiperplasia das células de Kupffer (FIGURAS 27 e 28).

Nos animais tratados com a diluição de 1:100, verificamos nas análises histológicas a presença de dilatação da veia centrolobular e hiperplasia das células de Kupffer e tumefação turva (FIGURAS 29 e 30), enquanto na diluição de 1:50 verificamos uma intensa hemorragia sinusoidal, dilatação portal e hiperplasia das células de kupffer (FIGURAS 31 e 32). Já nos animais tratados com ciclofosfamida (20 mg/Kg), observamos a presença de intensidade tumefação turva e considerável hiperplasia da células de Kupffer (FIGURAS 33 e 34).

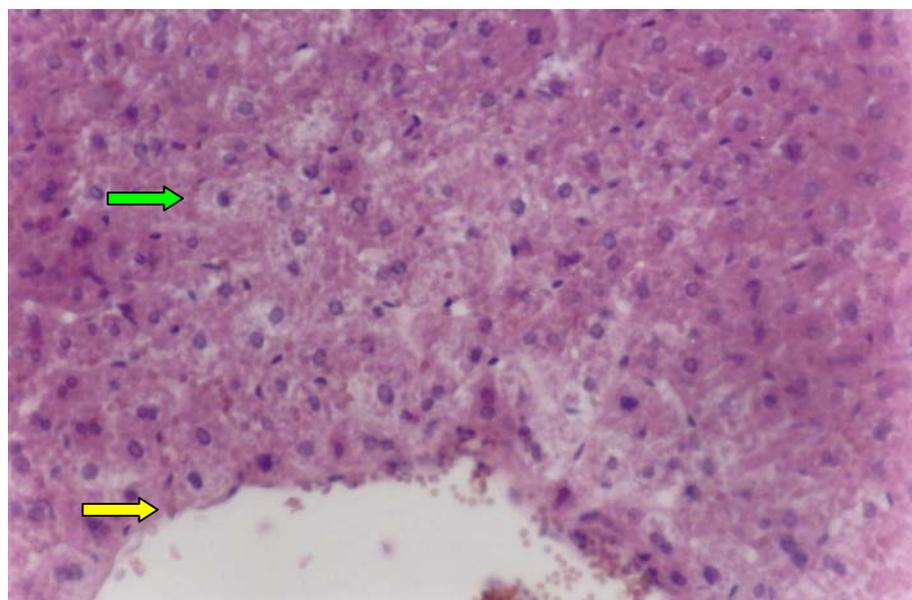


FIGURA 24. Fotomicrografia histológica do Fígado do animal controle negativo. Apresentando leve tumefação turva (seta verde) e dilatação da veia centrolobular (seta amarela) (HE 20X)

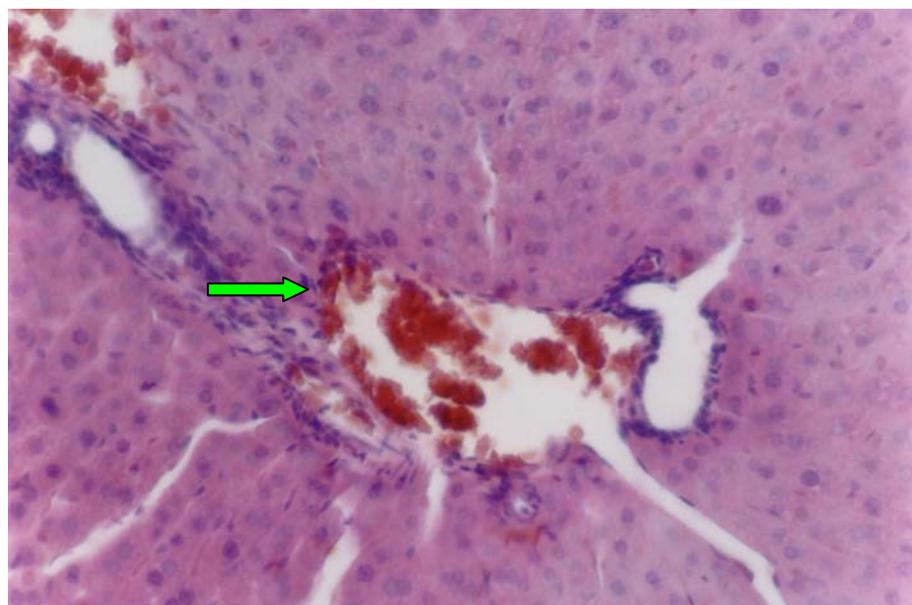


FIGURA 25. Fotomicrografia histológica do Fígado do animal controle negativo. Presença de dilatação portal (seta verde) (HE 20X)

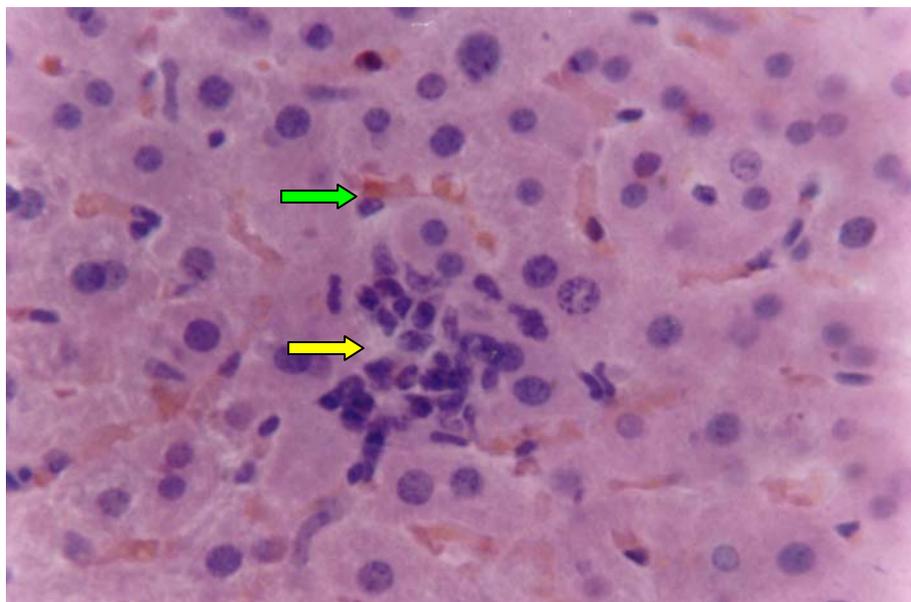


FIGURA 26. Fotomicrografia histológica do Fígado (diluição 1:500 do formocresol). Presença de foco inflamatório (seta amarela) e hemorragia sinusoidal (seta verde) (HE 40X)

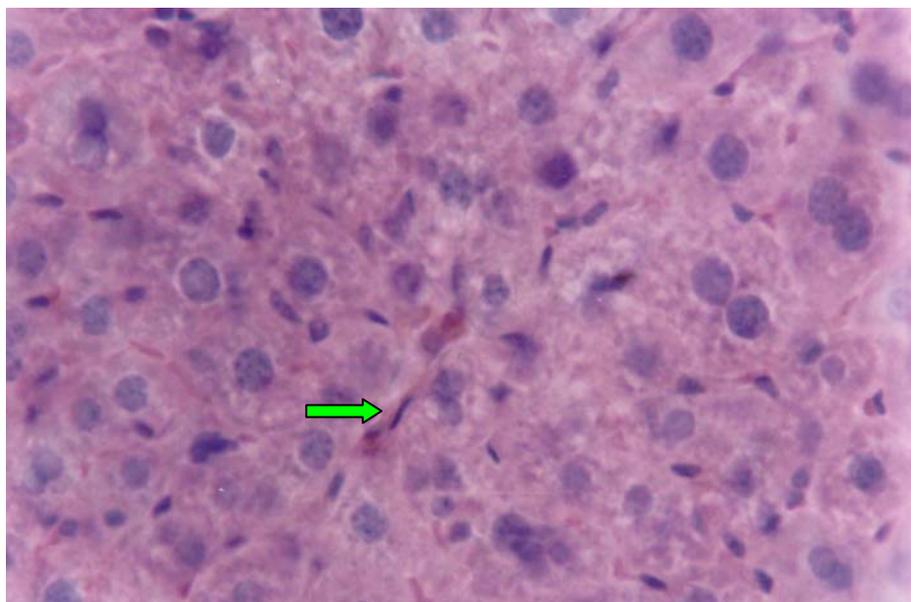


FIGURA 27. Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:500 do formocresol). Presença de hiperplasia das células de Kupffer (seta verde) (HE 40X)

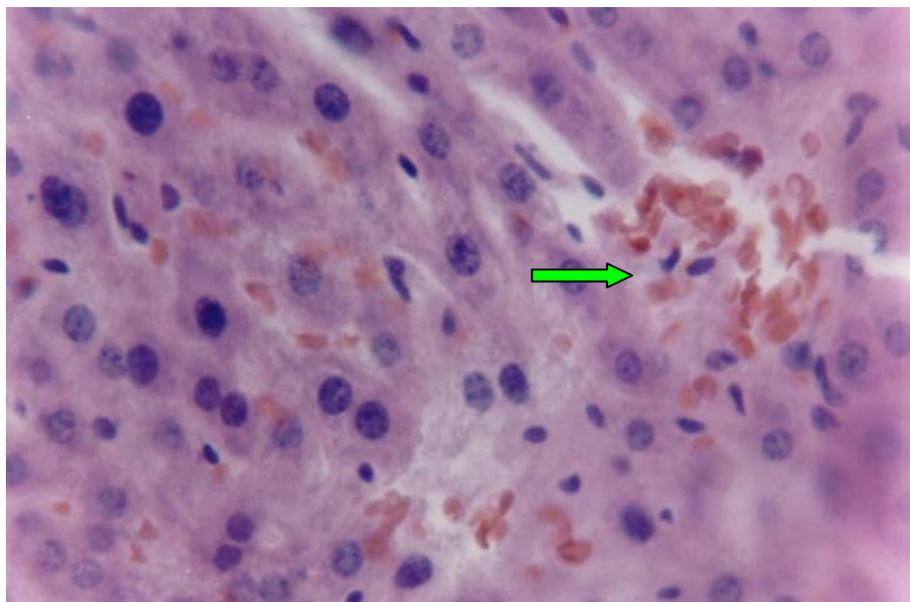


FIGURA 28. Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:1000 do formocresol). Presença de hemorragia sinusoidal (seta verde) (HE 40X)

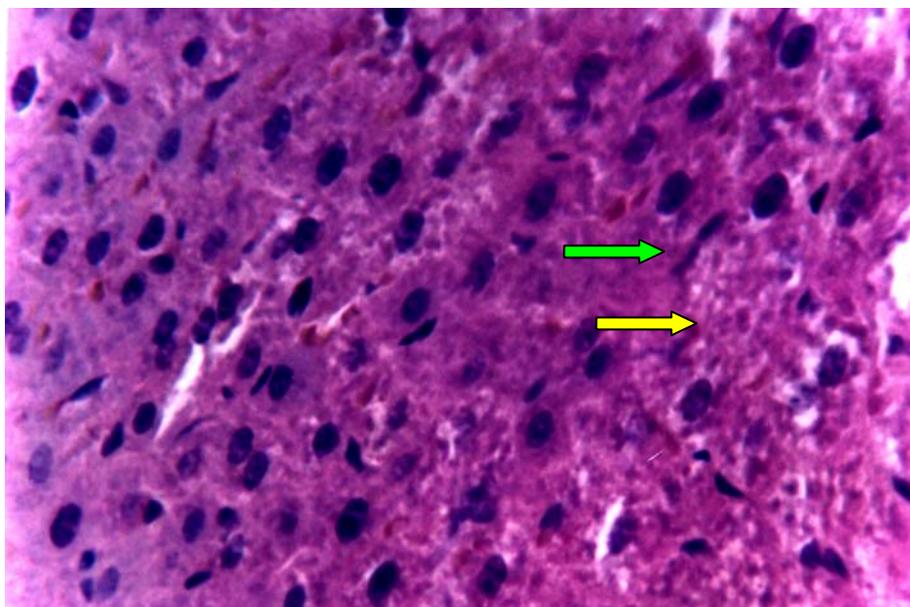


FIGURA 29. Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:100 do formocresol). Presença de hiperplasia das células de Kupffer (seta verde) e tumefação turva (seta amarela) (HE 40X)



FIGURA 30. Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:100 do formocresol). Apresentando dilatação portal (seta amarela) e tumefação turva (HE 20X)

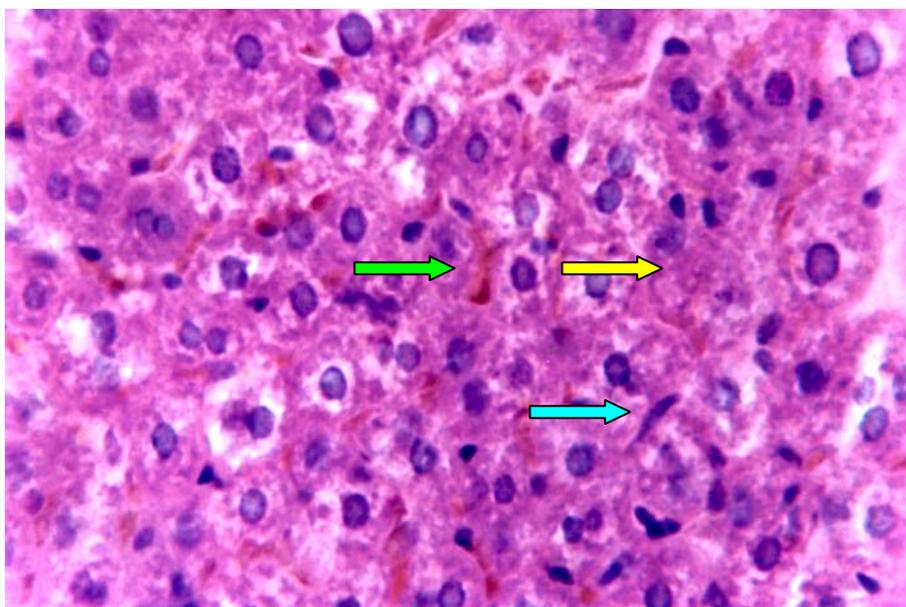


FIGURA 31. Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:50 do formocresol). Apresentando hemorragia sinusoidal (seta verde) e hiperplasia das células de Kupffer (seta azul) e tumefação turva (seta amarela) (HE 40X)

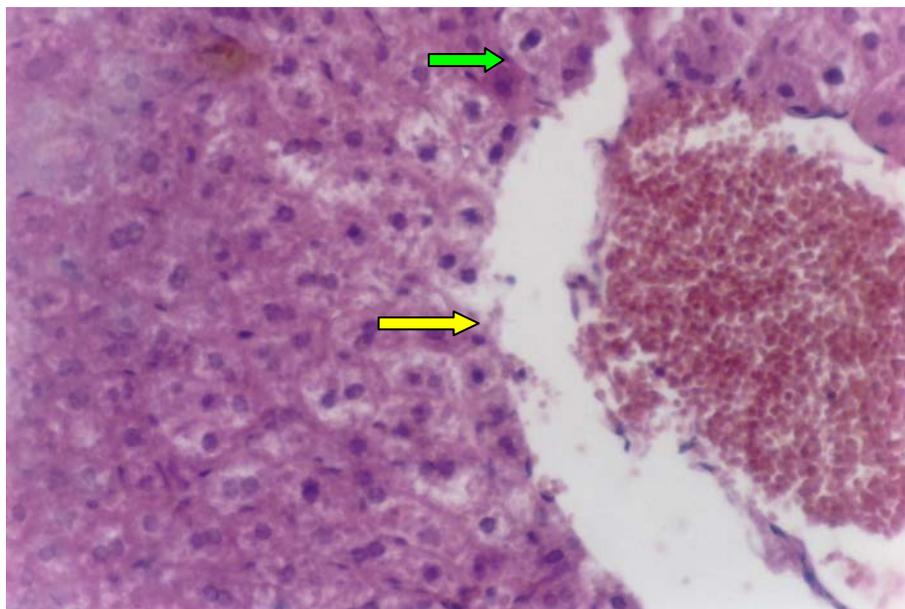


FIGURA 32. Fotomicrografia do Fígado (diluição 1:50 do formocresol).
Apresentando tumefação turva (seta verde) e dilatação portal (seta amarelo) (HE 20X)

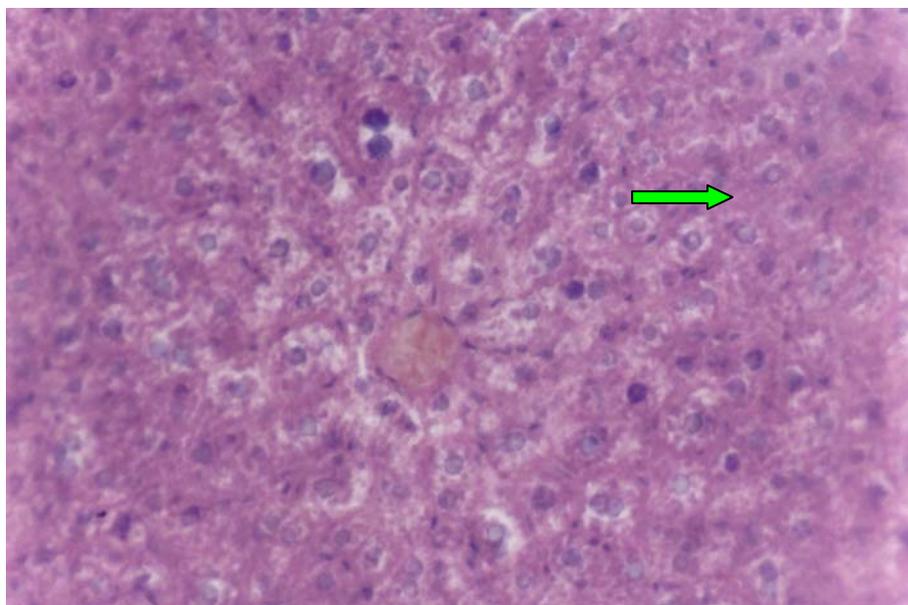


FIGURA 33. Fotomicrografia do Fígado (ciclofosfamida).
Presença intensa tumefação turva (seta verde) (HE 20X)

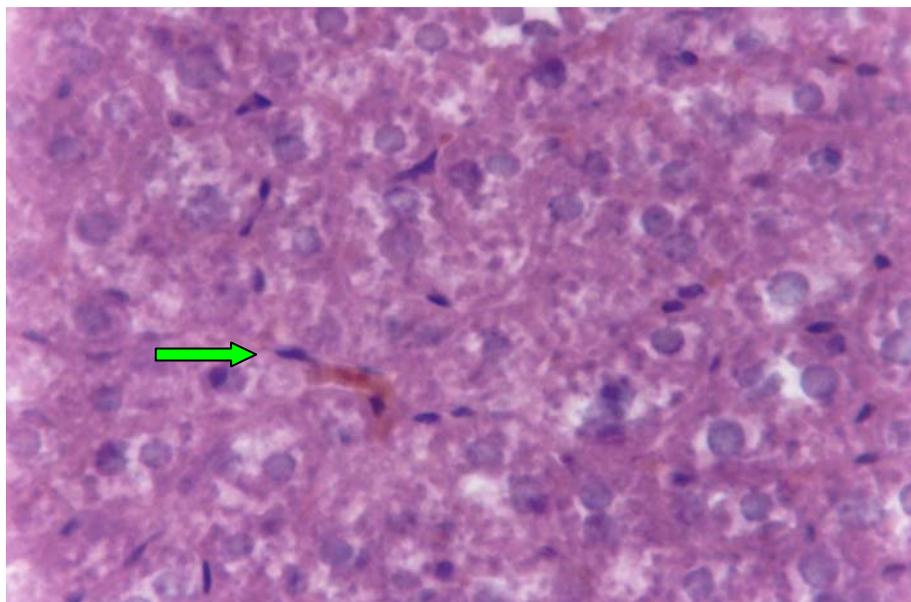


FIGURA 34. Fotomicrografia do Fígado (ciclofosfamida).
Presença de hiperplasia das células de Kupffer (seta verde) (HE 40X)

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A pulpotomia realizada com formocresol é um procedimento comumente utilizado para o tratamento de polpas inflamadas em dentes decíduos decorrentes de lesões cariosas profundas (BEZERRA et al., 2002). Esta técnica foi introduzida em 1904 e continua sendo empregada pelos cirurgiões-dentistas, seguindo as especificações de Koch et al. (1992), Issão e Guedes-Pinto (1993), Pinkham (1994), Guedes-Pinto (1995), Matewson e Primosch (1995) e Corrêa (1998). Apesar dos estudos sobre os efeitos mutagênicos e carcinogênicos, de medicamentos contendo aldeídos, relatados por Lewis e Chestner (1981), Kenny e Judd (1987) e dos estudos em drosófilas descritos por Rapoport (1946) e em culturas de células humanas (GOLDMACHER e THILLY, 1983), 76,8% das Faculdades de Odontologia em todo o mundo continuam utilizando o formocresol como o medicamento de escolha para a realização de pulpotomias de decíduos (AYRAM e PULVER, 1989).

O uso do formocresol na pulpotomia de dentes decíduos é bastante discutido entre pesquisadores pelo potencial mutagênico do formaldeído, constituinte de sua composição. Resultados obtidos ainda em 1946 por Rapoport, e outros realizados em datas mais recentes têm revelado que o formaldeído é efetivo em induzir tanto mutações gênicas quanto aberrações cromossômicas (ALDERSON, 1964; GOLDMACHER e THILLY, 1983; BLAIR et al., 1986; BLAIR e STEWART, 1990; BLAIR et al., 1990; GRAFSTROM et al., 1993, STEWART e BLAIR, 1994; MERK e SPEIT, 1998; FIGGS et al., 1998; HILDESHEIM et al., 2001; SOFFRITTI et al., 2002; HESTER et al., 2003; HAUPTMANN et al., 2003). De fato, a adoção de tal procedimento tem, contudo, sido questionada com fundamentação em estudos que apontam para os efeitos mutagênicos e carcinogênicos de medicamentos a base de aldeídos (RAPOPORT, 1946; LEWIS e CHESTNER, 1981; GOLDMACHER e THILLY, 1983; KENNY e JUDD, 1987).

Nos nossos achados, a soma de todos os micronúcleos encontrados dentre o grupo de animais tratados após 24h em relação ao grupo de animais tratados pós 48h, difere significativamente. Entretanto ao retirar dessa soma o número de micronúcleos induzidos por ciclofosfamida, observa que não há diferença entre a

quantidade de micronúcleos do grupo do formocresol em diferentes diluições nas 24h em relação ao grupo das 48h, desse modo a diferença encontrada anteriormente deve-se ao possível efeito mutagênico ciclofosfamida (SALAMONE et al., 1980).

Apesar da resposta celular nas menores diluições do formocresol (1:50, 1:100, 1:500) em 24h, não se traduzir em uma maior ocorrência de micronúcleos, o que provavelmente se deve a um efeito genotóxico, induzindo resposta apoptótica, e/ou a um efeito citotóxico. Estudos em células esfoliadas, em que paralelamente à análise de micronúcleos foi registrada a ocorrência de eventos nucleares degenerativos, indicadores de apoptose, os resultados obtidos sugerem que sob exposições mais intensas a resposta apoptótica é disparada mascarando a real ocorrência de micronúcleos (FREITAS, 1999; SANTOS, 2003). Esse fato justificaria a não expressiva presença de micronúcleos em menores diluições do formocresol, enquanto que na diluição de 1:1000, houve efetiva indução de micronúcleo, tanto quanto a ciclofosfamida, o que fortemente o aponta para os efeitos mutagênicos desse composto.

Diferentemente do observado no grupo de sacrifício das 24h, não foi verificada diferença na indução de micronúcleos entre os animais sacrificados nas 48h pós-exposição ao formocresol na diluição 1:1000. É possível que esse resultado seja devido ao tempo de permanência de ação do formocresol, que poderia ter sido metabolizado e excretado em tempo anterior.

Acrescentado aos achados do teste de micronúcleo, identificamos nos ensaios da análise do cometa a predominância em todas as diluições testadas do Formocresol os chamados *crosslinks*, os quais modificam a estrutura do DNA, sem no entanto causar a migração do DNA, os chamados cometas. Esse fato, provavelmente decorre do intercalamento entre DNA-proteína ou DNA-DNA, os quais são induzidos por diversos agentes químicos, a exemplo do arsênio, níquel bem como, do formaldeído (MERK et al., 2000). Na composição do formocresol comercializado, o formaldeído está presente numa concentração de 19%. O mesmo é considerado uma substância química altamente reativa, principalmente com os

grupos amino, resultando na formação de adutos de Schiffs, que podem conseqüentemente, formar ligações cruzadas, possivelmente sendo responsáveis pelos crosslinks (AUERBACH et al., 1977). Essas ligações são fortemente reativas e não específica, tendo afinidade a proteínas e ácidos nucléicos (FELDMAN, 1973; GRAFSTROM et al., 1983), o que corrobora com os nossos achados. Não está esclarecido entretanto, se o *crosslinks* DNA-proteína induzido pelo formaldeído causa diretamente uma mutação e que tipo de mutação poderá ser responsável pela carcinogênese.

Numerosos estudos têm mostrado que o formaldeído é genotóxico e mutagênico para células animais e que induzem um largo espectro de alterações genéticas (CONAWAY et al., 1996). Estudos em animais tem demonstrado que a elevada concentração de formaldeído causa danos irreversíveis no epitélio nasal de ratos, e que em alguns casos, ratos expostos a essas mesmas concentrações desenvolvem neoplasia (IARC, 1995). Além disso, diversos estudos realizados em animais e células em cultura apontam toxicidade e mutagenicidade bem como, efeitos carcinogênicos do formaldeído (LEWIS, 1998; SPEIT e MERK, 1998; SOFFRITTI et al., 2002). Fundamentados nestes estudos, Lewis (1998) chama a atenção para a necessidade urgente de desencorajar o uso de terapia pulpar com aldeídos, já que, atualmente, medicamentos menos tóxicos e com eficácia semelhante estão disponíveis.

Decorrente desses fatos, muitos são os estudos sobre os efeitos da absorção sistêmica do formaldeído a partir dos sítios de pulpotomias. Embora a toxicidade sistêmica não tenha sido, experimentalmente, avaliada em humanos, por razões óbvias, dados obtidos no nosso estudo de toxicidade aguda pelo método *Up-and-Down*, mostrou na avaliação da toxicidade, que o formocresol comercialmente utilizado, provocou tremores, convulsão e morte imediata nos animais após sua administração, enquanto os animais tratados com a diluição de 1:10 do produto, foi capaz de matar os 10 animais nas primeiras 2 horas de observação. Durante a realização do estudo, em todas as diluições do formocresol houve morte no grupo de animais estudados, porém não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao tempo de exposição do formocresol. Fato este relevante no que diz respeito a

grande toxicidade da droga, provavelmente, devido á presença na sua formulação do formaldeído, substância comprovadamente tóxica.

A absorção sistêmica do formocresol ocorre rapidamente, em média 5 min após a aplicação sobre a polpa dental, de acordo com os estudos de Ranly (1985), resultando em mudanças teciduais em rim e fígado, levando a diminuição da largura do complexo de Bowman, decorrente do edema no ramo glomerular e a falta da aparência sinusoidal característica de edema celular, respectivamente. Esses achados foram parcialmente observados, através da investigação histopatológica, onde, alterações reversíveis no fígado, descritas como hiperplasia das células de Kupffer e hemorragia sinusoidal estavam presentes em todas as diluições do formocresol testadas nas primeiras 24h. Essas alterações indicam o intenso metabolismo hepático, descrito na literatura como alterações provocadas pelo formocresol após absorção sistêmica, a partir dos sítios de pulpotomia. Esses fatos confirmam outros estudos que tem demonstrado as alterações em diversos tecidos e órgãos alvos (MYERS et al., 1978; PASHLEY et al., 1980; MEYS et al., 1983).

Essas observações fortalecem os dados encontrados nos nossos experimentos durante a determinação da toxicidade aguda, em que mudanças teciduais no fígado, avaliados histologicamente sugerem indícios de dano celular. Essa agressão tecidual foi verificada com o grupo Formocresol tratado em todas as diluições nas 24h, porém no grupo controle negativo, que tomou o veículo da formulação, glicerina, verificamos a presença de tumefação turva, característica de intensa atividade metabólica, presente também nos animais tratados com formocresol nas 24h.

A falta de dados concretos sobre os efeitos sistêmicos em humanos, possivelmente alicerça a permanência do tratamento pulpar com o formocresol, uma vez que pode ser questionada a validade da extrapolação para o homem de dados obtidos em experimentos com animais. Vale também ressaltar, que em alguns estudos em animais foram utilizadas quantidades da substância superiores àquelas que são utilizadas nas pulpotomias em dentes decíduos humanos. É válido, contudo, o alerta de que o formocresol é absorvido e distribuído pelo organismo e que sob

determinadas doses, seus efeitos sistêmicos são traduzidos por alterações histopatológicas em órgãos vitais como rim e fígado (PASHLEY et al., 1980; MYERS et al., 1983; RANLY, 1985; RANLY e HORN, 1987).

Desse modo, de acordo com Pinkham (1996) o medicamento ideal para recobrimento da polpa deveria apresentar características como: ser bactericida, não causar dano a polpa e estruturas circundantes, favorecer a cicatrização da polpa radicular, e não interferir no processo fisiológico de reabsorção radicular, entretanto esse agente químico ideal ainda não foi identificado. Em decorrência desse fato, uma preocupação constante recai sobre o Formocresol, uma vez que a concentração de Formocresol utilizada na prática, pelos dentistas pediátricos em pulpotomias de dentes decíduos é a concentração total da formulação comercializada (KING et al., 2002), apesar da maioria dos protocolos pediátricos preconizarem a diluição 1:5 de Buckley (STRAFFON e HAN, 1968; LOOS e HAN, 1971; GARCIA-GODOY, 1981; KOCH et al., 1992; ISSÃO e GUEDES-PINTO, 1993; PINKHAM, 1994; GUEDES-PINTO, 1995; MATEWSON e PRIMOSCH, 1995; CORRÊA, 1998).

Os estudos clínicos e radiográficos têm demonstrado que as pulpotomias com formocresol tem um índice de êxito entre 70 a 97% (ROLLING e THYLSTRUP, 1975; FUKS e BIMSTEIN, 1981) e em torno de 70% a 100% segundo Cameron e Widmer (1997), entretanto quando se estudou por um período de três anos, Rolling e Thystrup (1975) encontraram uma diminuição das taxas de sucesso de 91% para 70%, enquanto Guelmann et al. (2002) observaram apenas 31% de sucesso após 365 dias e para Magnusson (1977), somente 20%. Essas observações corroboram os estudos de Russo e Oliveira (1975), Block et al. (1983), Araújo (1987), Giro et al. (1991) e Fuks (2000) em que os estudos histológicos revelam reações adversas, que vão desde inflamação grave à necrose pulpar. Estes estudos, provam a não existência do princípio da biocompatibilidade, porém muitos profissionais justificam a pulpotomia realizado com o Formocresol baseados no “sucesso clínico”, evidenciado por não interferir na recuperação prolongada do tecido conjuntivo e por suprimir a resposta inflamatória inicial de modo significativo (STRAFFON e HAN, 1968).

De modo geral, o Formocresol apresenta potencial mutagênico, porém ainda não há comprovação científica do seu efeito carcinogênico, esse fatos vem sendo determinantes para desencorajar o uso do Formocresol, não parecendo sensato, que a odontologia continue utilizando medicamentos que aumentem a predisposição ao aparecimento de doenças, já que o formaldeído é considerado tóxico, mutagênico e carcinogênico. Tais resultados têm estimulado a busca de alternativas terapêuticas que apresentem segurança e propiciem sucesso clínico atestado radiográfico e histologicamente (CAETANO e SANDRINI, 2000). O que nos faz inferir da importância de usar métodos alternativos para a realização da pulpotomia, em que os efeitos tóxicos induzidos pelo Formocresol possam ser minimizados. Atualmente, algumas alternativas tem sido, sugeridas, como o Sulfato Férrico (IBRICEVIC e AL-JAME, 2000; BURNET e WALKER, 2002; CASAS et al., 2003), Eletrocirurgia (MACK e DEAN, 1993; ZTAS et al., 1994; EL-MELIGY et al., 2001; DEAN et al., 2002), Trióxido Mineral Agregado (MTA) (EIDELMAN et al., 2001), e o Laser CO₂ (ELLIOTT et al., 1999).

Considerações Finais

Diante do exposto, é necessário rever se o formocresol é um produto ou medicamento; segundo a Vigilância Sanitária, medicamento para a Lei nº 5.991 de 17 de Dezembro de 1973 “é um produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnósticos”. Como correlato e não como medicamento o formocresol, que é um produto farmacêutico, industrializado, utilizado com finalidade curativa, pode, obter revalidação para sua comercialização sem a necessidade de investigações quanto sua segurança e toxicidade.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Formocresol (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda.), utilizado na prática odontológica, apresentou elevada toxicidade aguda, levando todos animais a morte durante as 24h de observação.

Nas análises histopatológicas do fígado após 24h de tratamento com o formocresol nas diluições de 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000 mostrou potencial hepatotóxico, evidenciado pelo processo inflamatório.

O formocresol na diluição 1:1000 após 24h de tratamento induziu a formação de micronúcleos, revelando o seu potencial mutagênico.

O formocresol na diluições de 1:750, 1:1000 e 1:2000 induziu a formação de *crosslinks*, revelando o seu potencial genotóxico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERSON, T. The mechanism of formaldehyde-induced mutagenesis. The monohydroxymethylation reaction of formaldehyde with adenylic acid as the necessary and sufficient condition for the mediation of the mutagenic activity of formaldehyde. **Mutat. Res.**, v. 1, p. 77-85, 1964

ANDERSON, D. et al. Effects in the comet assay of storage conditions on human blood. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, p. 115-125, 1997.

ANDERSON, D.; YU, T-W.; PHILLIPS, B. J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet Assay. **Mutat. Res.**, v. 307, p. 261-271, 1994.

ARAUJO, O. M. B.; PAVARINE, A.; PINHEIRO, C. E.; LIMA, J. E. O.; ABDO, R. C. C. Efeitos do ácido sulfossalicílico-cresol e do formocresol sobre os tecidos pulpar e periapical em dentes decíduos de cão: estudo histológico. **Odontol. Mod.**, v. 14, n. 4, p. 6-16, 1997

AUERBACH, C.; MOUTSCHEN-DAHMEN, M.; MOUTSCHEN, J. Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds. **Mutat. Res.**, v. 39, p. 317-362, 1977.

AVRAM, D. C.; PULVER, F. Pulpotomy medicaments for vital primary teeth. **J. Dent. Child.**, v. 56, n. 6, p. 426-434, 1989.

BEALL, J. R.; ULSAMER, A. C. Formaldehyde and hepatotoxicity: a review. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 1984.

BERGER, J. E. Pulp tissue reaction to formocresol and zin-oxide eugenol. **J. Dent. Child.**, v. 32, p. 13-28, 1965

BEZERRA, A. C. B. ANTONIO, L. de; TOLEDO, O. A. Efeitos locais e sistêmicos de formocresol utilizado após pulpotomia em dentes decíduos – Revisão da Literatura. **J. Bras. Odontopediatr. Odontol. Bebê**, v. 5, n. 28, p. 518-521, 2002.

BLAIR, A.; SARACCI, R.; STEWART, P. A.; HAYES, R. B.; SHY, C. Epidemiologic evidence on the relationship between formaldehyde exposure and cancer. **Scand. J. Work Environ. Health**, v. 16, n. 6, p. 381-393, 1990.

BLAIR, A.; STEWART, P.; O'BERG, M.; GAFFEY, W.; WALRATH, J.; WARD, J., BALES, R.; KAPLAN, S. Mortality among industrial workers exposed to formaldehyde and Cubit, D. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 76, n. 6, p. 1071-1084, 1986.

BLAIR, A.; STEWART, P. A. Correlation between different measures of occupational exposure to formaldehyde. **Am. J. Epidemiol.**, v. 31, n. 3, p. 510-516, 1990.

BLOCK, R. M. et al. Systemic Distribution of (C14) – labeled paraformaldehyde incorporated within formocresol following pulpotomies in dogs. **J. Endod.**, v. 9, n. 5, p. 176-89, 1983.

BRAGANÇA-PEREIRA, C. A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MAONTELEONE NETO, R. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

BRAMANTE, C. M. et al. Irritabilidade de alguns fármacos usados como curativo de demora em endodontia. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 10, n. 2, p. 115-119, 1996.

BURNETT, S.; WALKER, J. Comparison of ferric sulfate, formocresol, and a combination of ferric sulfate / formocresol in primary tooth vital pulpotomies: A retrospective radiographic a survey. **J. Dent. Child.**, p. 44-48, 2002.

CAETANO, S. H. G.; SANDRINI, J. C. Novas tendências da pulpotomia de dentes decíduos. **J. Bras. Odontopediatr. Odontol. Bebê**, v. 3, n. 15, 2000.

CAMERON, A. C.; WIDMER, R. P. Pulp therapy for primary and young permanent teeth. In: _____ **Handbook of pediatric dentistry**. Barcelona: grafos S. A., 1997, p. 83-94.

CÁRDENAS, J. G. Acción histológica-química y farmacológica del formocresol. **Temas Odontológicos**, v. 10, n. 94, p. 215-218, 1968.

CASAS, M. J.; LAYUG, M. A.; KENNY, D. J.; JOHNSTON, D. H.; JUDD, P. L. Two-year outcomes of primary molar ferric sulfate pulpotomy and root canal therapy. **Pediatr. Dent.**, v. 25, n. 2, p. 97-102, 2003.

CHAMBERS, H. F. Outros agentes antimicrobianos, desinfetantes, anti-sépticos e esterilizantes. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003, p. 736-743.

CHOY, W. N. Regulatory Genetic toxicology tests. In: **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001, p. 93-113.

CONAWAY, C. C.; WHYSNER, J.; VERNA, L. K.; WILLIAMS, G. M. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. **Pharmacol. Ther.**, v. 71, p. 29-55, 1996.

CORRÊA, M. S. N. P. Tratamento pulpar de dentes decíduos. In: _____ **Odontopediatria na primeira infância.**, São Paulo: Santos, 1998, p. 482-485.

DE DEUS, Q. D. **Endodontia**, 5ª ed., Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 695 p.

DEAN, J. A.; MACK, R. B.; FULKERSON, B. T.; SANDERS, B. J. Comparison of electrosurgical and formocresol pulpotomy procedures in children. **Int. J. Pediatr. Dent.**, v. 12, p. 177-182, 1992.

DEPASS, L. R. Alternative approaches in median lethality (LD50) and acute toxicity testing. **Toxicol. Lett.**, v. 49, p.159-170, 1989.

DOYLE, W. A.; MCDONALD, R. E.; MITCHELI, D. F. Formocresol versus calcium hydroxide in pulpotomy. **J. Dent. Child.**, v. 29, p. 86-97, 1962.

EGLE, J. L.; VA, R. Retention of inhaled formaldehyde, propionaldehyde, and acrolein in the dog. **Arch. Environ. Health**, v. 25, 1972.

EIDELMAN, E.; HOLAN, G.; FUKS, A. B. Mineral trioxide aggregate vs. formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. **Pediatr. Dent.**, v. 23, n. 1, p. 15-18, 2001.

ELLIOTT, R. D.; ROBERTS, M. W.; BURKES, J.; PHILLIPS, C. Evaluation of the carbon dioxide laser on vital human primary pulp tissue. **Pediatr. Dent**, v. 21, p. 327-331, 1999.

EL-MELIGY, O.; ABDALLA, M.; EL-BARAWAY, S.; EL-TEKYA, M.; DEAN, J. A. Histological evaluation of electrosurgery and formocresol pulpotomy techniques in primary teeth in dogs. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 26, n. 1, p. 81-85, 2001.

EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 5-10, 1997.

EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia faba* roots and the effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: production of micronuclei. **Int. J. Rad. Biol.**, v. 1, p. 230-240, 1959.

FEINMAN, S. **Formaldehyde sensitivity and toxicity**. Press, Boca Raton, FL.:CRC, 1988.

FELDMAN, M. Y. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. **Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 13, p. 1-49, 1973.

FIGGS, L. W.; STEWART, P. A.; BLAIR, A. The impact of initial job assignment on formaldehyde exposure among African-American and white formaldehyde industry workers. **Am. J. Ind. Med.**, v. 34, n. 1, p. 57-64, 1998.

FREITAS, V. S. **Avaliação dos efeitos citogenéticos de fatores considerados de risco para o câncer bucal**. Dissertação (Mestrado) Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, 1999.

FUKS, A. B.; BIMSTEIN, E. Clinical evaluation of diluted formocresol pulpotomies in primary teeth of school children. **Pediatric. Dent.**, v. 3, n. 4, p. 321-324, 1981.

FUKS, A. B. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. **Pediatr. Dent.**, v. 44, n. 3, p. 571-596, 2000.

GARCIA-GODOY, f. A classification for traumatic injuries to primary and permanent teeth. **J. Pedod.**, v. 5, n. 4, p. 295-297, 1981.

GARCIA-GODOY, F.; OLIVO, M. Propriedades químico-farmacológicas del formocresol. **Temas odont.**, v. 15, n. 126-127, p. 45-54, 1977.

GIMMLER-LUZ, M. C.; ANDRADE, H. H. R. de; MARAFON-BAYER, A. T. Benzidine- and diaminobenzidine-induced micronuclei in mice after intraperitoneal and oral single or multiple treatment. **Braz. J. Genet.**, v. 20, n. 2, p. 247-252, 1997.

GIMMLER-LUZ, M. C.; ERDTMANN, B. Clastogenic activity of integerrimine determined in mouse micronucleus assays. **Braz. J. Genet.**, v. 20, n. 3, p. 405-409, 1997.

GIRO, E. M. A.; BAUSELLS, H. I. I.; PERCINOTO, C. Estudo histopatológico em molares decíduos de cães, com polpa vitais, submetidos à pulpotomia e proteção com hidróxido de cálcio, formocresol e glutaraldeído. **Rev. Odonto. UNESP**, v. 20, n. 1, p. 51-62, 1991.

GOLDMACHRER, V. S.; THILLY, W. G. Formaldehyde is mutagenic for cultured human cells. **Mutat. Res.**, v. 116, n. 3-4, p. 417-422, 1983.

GONTIJO, A. M. M. C.. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Rio Grande do Sul: Editora da ULBRA, 2003, p. 247-279.

GRAFSTRÖM, R. C. In vitro studies of aldehyde effects that relate to human respiratory carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 238, n. 175-184, 1990.

GRAFSTRÖM, R. C.; FORNACE Jr., A. J.; AUTRUP, H.; LECHNER, J. F.; HARRIS, C. C. Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. **Science**, v. 220, p. 216-218, 1983.

GRAFSTRÖM, R. C.; HSU, I-C.; HARRIS, C. C. Mutagenicity of formaldehyde in Chinese hamster lung fibroblasts: synergy with ionizing radiation and n-nitros-n methylurea. **Chem. Biol. Interact.**, v. 86, n. 1, p. 41-49, 1993.

GUEDES-PINTO, A. C. In: **Odontopediatria**. 5ª ed., São Paulo: Santos Editora, 1995, p. 667-671.

GUELMANN, M.; FAIR, J.; TUNER, C.; COURTS, F. J. The success of emergency pulpotomies in primary molars. **Pediatric Dentistry**, v. 24, n. 3, p. 217-220, 2002.

HAN, S. S.; MORAWA, A. P.; STRAFFON, L. H.; CORPRON, R. E. Clinical evaluation of pulpotomies using dilute formocresol. **J. Dent. Child.**, v. 42, p. 360-363, 1975.

HARRISON, J. W.; MADONIA, J. V. The toxicity of parachlorophenol. **Oral Surg.**, v. 32, n. 1, p. 90-99, 1971.

HAUPTMANN, M.; LUBIN, J. H.; STEWART, P. A.; HAYES, R. B.; BLAIR, A. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 95, n. 21, p. 1615-1623, 2003.

HE, J. L.; CHEN, W. L.; JIN, L. F.; JIN, H. Y. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutat. Res.**, n. 469, p. 223-231, 2000.

HECK, H. D.; CASANOVA, M.; STARR, T. B. Formaldehyde toxicity - new understanding. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 20, p. 397-426, 1990.

HEDDLE, J. A. A rapid in vitro test for chromosome damage. **Mutat. Res.**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutat. Res.**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HESTER, S. D.; BENAVIDES, G. B.; YOON, L.; MORGAN, K. T.; ZOU, F.; BARRY, W.; WOLF, D. C. Formaldehyde-induced gene expression in F334 rat nasal respiratory epithelium. **Toxicology**, v. 187, p. 13-24, 2003.

HIDALGO, M. M.; KAWANA, G. R. C.; GONÇALVES, C. E. B.; OLIVEIRA, R. M. M. W. de; BERSANI-AMADO, C. A. Avaliação da tolerância tecidual a algumas substâncias utilizadas como curativo de demora no tratamento endodôntico. **Rev. Fac. Odontol. Lins**, v. 11, n. 2, p. 5-9, 1999.

HILDESHEIM, A.; DOSEMECI, M.; CHAN, C. C.; CHEN, C. J.; CHENG, Y. J.; HSU, M. M.; CHEN, I. H.; MITTL, B. F.; SUN, B.; LEVINE, P. H.; CHEN, J. Y.; BRINTON, L. A.; YANG, C. S. Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, n. 11, p. 1145-1153, 2001.

HOBSON, P. Pulp treatment of deciduous teeth. Part 2. Clinical investigation. **Br. Dent. J.**, v. 128, n. 6, p. 275-282, 1970.

HOWELL, N. K.; BADI, F. Elucidation of the Effect of Formaldehyde and Lipids on Frozen Stored Cod Collagen by Ft-Raman Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 52, p. 1440-1446, 2003.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: wood dust and formaldehyde. IARC Scientific Publications, n. 62, 1995.

IBRICEVIC, H.; AL-JAME, Q. Ferric Sulfate as pulpotomy agent in primary teeth: twenty month clinical follow-up. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 24, n. 4, p. 269-272, 2000.

ISSÁO, M.; GUEDES-PINTO, A. C. **Manual de odontopediatria**. 8^a ed., São Paulo: Artesmédicas, 1993, p. 159-61.

JENSSEN, D.; RAMEL, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. **Mutat. Res.**, n. 75, p. 191-202, 1980.

JUDD, P. L.; KENNY, D. J. Formocresol concerns. A review. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 53, n. 5, p. 401-401, 1987.

KELLER, D. A.; HECK, H. D.; RANDALL, H. W.; MORGAN, K. T. Histochemical localization of formaldehyde dehydrogenase in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 106, n. 2, p. 311-326, 1990.

KENNY, D. J.; JUDD, P. L. Time to reconsider the use of aldehydes in children's dentistry. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 53, n. 5, p. 333, 1987

KING, S. R. A.; MC WHORTER, A. G.; SEALE, N. S. Contraction of formocresol used by pediatric dentists in primary tooth pulpotomy. **Pediatr. Dent.**, v. 24, n. 2, p. 157-159, 2002.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, n. 363, p. 89-96, 1996.

KOCH, G.; MODEÉR, T.; POULSEN, S.; RASMUSSEN, P. **Odontopediatria: uma abordagem clínica**. 1^a ed. São Paulo: Santos, 1992, p. 189-93.

LEWIS, B. B.; CHESTNER, S. T. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. **JADA**, v. 103, n. 3, p. 429-434, 1981.

LEWIS, B. Formaldehyde in dentistry. A review for the millennium. **J. Clin. Ped. Dent.**, v. 22, n. 2, p. 167-177, 1998.

LIJINSKY, W. Importance of animal experiments in carcinogenesis research. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 11, n. 3, p. 307-14, 1988.

LONGWILL, D. G.; MARSHALL, F. J.; CREAMER, H. R. Reactivity of human lymphocytes to pulp antigens. **J. Endod.**, v. 8, n. 1, 1982.

LOOS, P. J.; STRAFFON, L. H.; HAN, S. S. Biological effects of formocresol. **J. Dent. Child.**, v. 40, p. 193-197, 1973

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992, p. 1-71

LOVELL, D. P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies. **Teratog. Carcinog. Mutag.**, v. 19, n. 109-119, 1999.

MA, Te-H.; HARRIS, M. M. Review of the genotoxicity of formaldehyde. **Mutat. Res.**, v. 196, p. 37-59, 1988.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat. Res.**, v. 189, p. 103-112, 1987.

MACK, R. B.; DEAN, J. A. Electrosurgical pulpotomy: a retrospective human study. **J. Dent. Child.**, p. 107-114, 1993.

MAGNUSSON, B. O. Therapeutic pulpotomies in primary molars with the formocresol technique: a clinical and histological follow-up. **Acta Odontol. Scand.**, v. 2, p. 157-165, 1977.

MARRAZZINI, A.; BETTI, C.; BERNACCHI, F.; BARRAI, I.; BARALE, R. Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons. **Mutagenesis**, v. 9, n. 6, p. 505-515, 1994.

MARRAZZINI, A.; CHELOTTI, L.; BARRAI, I.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. In vivo genotoxic interactions among three phenolic benzene metabolites. **Mutat.**, n. 341, p. 29-46, 1994.

MASSLER, M.; MANSUKHANI, N. Effects of Formol-Cresol on dental pulp. **J. Dent. Child.**, v. 26, p. 277-297. 1959.

MATHEWSON, R. J.; PRIMOSCH, R. E. Pulp treatment. In: **Fundamentals of pediatric dentistry**. 3^a ed., Chicago: Quintessence, 1995, p. 257-67.

MATTER, B.; SCHMID, W. Treminon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 12, p. 417-425, 1971.

MAUTZ, W. J. Exercising animal models in inhalation toxicology: interactions with ozone and formaldehyde. **Environ. Res.**, v. 92, p. 14-26, 2003.

MERK, O.; REISER, K.; SPEIT, G. Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. **Mutat. Res.**, v. 471, p. 71-80, 2000

MERK, O.; SPEIT, G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein *crosslinks* for mutagenesis. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 32, p. 260-268, 1998.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutat. Res.**, n. 418, p. 131-140, 1998.

MORAIS DE, C. A. H.; BERNARDINELI, N.; GARCIA, R. B.; WESTPHALEN, V. P. D. Paramoclorofenol canforado e formocresol – empirismo x ciência. **J. Bras. Clin. Estet. Odontol.**, v. 5, n. 25, p. 31-33, 2001.

MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGI, T.; SASAKI, Y. F.; SATO, S.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; SUZUKI, T.; WAKATA, A.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group. **Mutat. Res.**, v. 389, n. 1, p. 3-122, 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, n. 65, p. 55-63, 1993.

MULLER, P.; RAABE, G.; SCHUMANN, D. Leukoplakia induce by repeated deposition of formalin in rabbit oral mucosa. **Exp. Pathol. Jena.**, v. 16, p. 36-42, 1978.

MYERS, D. R.; PASHLEY, D. H.; WHITFORD, G. M.; MCKINNEY, R. V. Tissue changes induced by the absorption of formocresol from pulpotomy sites in dogs. **Pediatric Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 6-8, 1983.

MYERS, D. R.; PASHLEY, D. H.; WHITFORD, G. M.; SOBEL, R. E.; MCKINNEY, R. V. The acute toxicity of high doses of systemically administered formocresol in dogs. **Pediat. Dent.**, v. 3, n. 1, p. 37-41, 1981.

MYERS, D. R.; SHOAF, H. K.; DIRKSEN, T. R.; PASHLEY, B. H.; WITFORD, J. M.; REYNOLDS, K. E. Distribution of ¹⁴C-formaldehyde after pulpotomy with formocresol. **JADA**, v. 96, n. 5, p. 805-813, 1978.

NATARAJAN, A. T. Techniques for biomonitoring of human population for genetic effects - Review Article. **Rev. Bras. Genet.**, v. 16, n. 3, p. 841-847, 1993.

NELSON, D. A. Hematopoiese. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais**. 16^a Ed. São Paulo: Editora Manole, 1989, p. 1005-1052.

NEPOMUCENO, J. C.; SPANÓ, M. A. Incidência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de tilápias (*Oreochromis mossambicus*) provindas de diferentes estações de piscicultura. **Rev. Cent. Cien. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia**, v. 8, n. 1, p. 7-15, 1992.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiat. Res.**, v. 122, p. 69-72, 1990.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Bleomicine, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 52, p. 683-691, 1987.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298, 1984.

OZTAS, N.; ULUSU, T.; OYGUR, T.; ÇOKPEKIN, F. Comparison of electrosurgery and formocresol as pulpotomy techniques in dog primary teeth. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 18, n. 4, 1994.

PASHLEY, E. L.; MYERS, D. R.; PASHLEY, D. H.; WHITFORD, G. M. Systemic distribution of C-formaldehyde from Formocresol - treated pulpotomy sites. **J. Dent. Res.**, v. 59, n. 3, p. 603-608, 1980.

PERERA, F.; PETITO, C. Formaldehyde: a question of cancer policy? **Science**, v. 216, n. 18, p. 1285-1291, 1982.

PINCU, M.; BASS, D.; NORMAN, A. An improved micronuclear assay in lymphocytes. **Mutation Res.**, v. 139, p. 61-65, 1984

PINKHAM, J. R. et al. Tratamiento pulpar para la detección primaria. In: **Odontologia pediátrica**. 2 ed. México: Interamericana. McGraw-Hill, 1996, p. 339-41.

RABELLO-GAY, M. N. Teste do micronúcleo em medula óssea. **Mutagênese, Interatogênese e Carcinogênese – Métodos e critérios de Avaliação**. São Paulo: FCA, 1991, p. 83-90.

RANLY, D. M. Assessment of the systemic distribution and toxicity of formaldehyde following pulpotomy treatment: part one. **ASDC J. Dent. Child.**, v. 52, n. 6, p. 431-434, 1985.

RANLY, D. M.; HORN, D. Assessment of the systemic distribution and toxicity of formaldehyde following pulpotomy treatment: part two. **ASDC J. Dent. Child.**, v. 54, n. 1, p. 40-44, 1987.

RAPOPORT, I. A. Carbonyl compounds and chemical mechanism of mutation. **Compt. Rend. Acad. Sci.**, v. 54, p. 65-67, 1946.

REDIG, D. F. A comparison and evaluation of two formocresol pulpotomy techniques utilizing "Buckley's" formocresol. **J. Dent. Child.**, v. 35, p. 22-30, 1968.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Rio Grande do Sul: Editora da ULBRA, 2003, p. 173-200.

ROBERTS, J. J.; STURROCK, J. E. Enhancement by caffeine of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations and chromosome aberrations in Chinese. **Mutat. Res.**, v. 20, n. 2, p. 243-55, 1973.

ROLLING, I.; POULSEN, S. Formocresol pulpotomy of primary teeth and occurrence of enamel defects on the permanent successors. **Acta Odontol. Scand.**, v. 36, n. 4, p. 243-247, 1978.

ROLLING, I.; THYLSTRUP, A. A 3-year clinical follow-up study of pulpotomized primary molars treated with the formocresol technique. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 83, p. 47-53, 1975.

RUSSO, M. C.; OLIVEIRA, J. D. Tissue reaction to calcium hydroxide or formocresol after pulpotomy in sound or inflamed deciduous pulps of dogs. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**, v. 4, n. 1, p. 7-15, 1975.

SALAMONE, M.; HEDDLE, J.; STUART, E.; KATZ, M. Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutation Res.**, v. 74, p. 347-356, 1980.

SALLES DE, C. L. F.; CONSOLARO, A.; PAVARINI, A.; TAVEIRA, L. A. A.; BIJELLA, M. F. T. B. Avaliação do potencial carcinogênico do formocresol diluído a 1/5 e do glutaraldeído a 2% no modelo experimental DMBA-induzido. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v. 2, n. 3, p. 5-11, 1994.

SANTOS, N. N. A. Danos citogenéticos e citológicos em indivíduos sob diferentes formas de exposição a mutágenos, avaliados pelo Teste de Micronúcleo (MN). Tese (Doutorado) Departamento de práticas de Saúde, Universidade de São Paulo, 2003.

SARTO, F.; TOMANIN, R.; GIACOMELLI, L.; IANNINI, G.; CUPIRAGGI, A. R. The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to

occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. **Mutation Research**, n. 244, p. 345-351, 1990.

SCHIMID, W. Chemical mutagen testing on in vivo somatic cells. **Agents Actions**, v. 3, p. 77-85, 1973

SCHIMID, W. In: HOLLAENDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection**, v. 4, p. 31-43, Plenum, New York, 1976.

SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SIGAL, M. J.; TITLEY, K.; PULVER, F.; ANDREWS, P.; LEVINE, N. Formocresol in primary teeth. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 64, n. 10, p. 680-684, 1998.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S. A., 2002. 1314p.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SITTERT, N. J. VAN.; BOOGAARD, P. J.; NATARAJAN, A. T.; TATES, A. D.; EHRENBURG, L. G.; TORNQVIST, M. A. Formation of DNA adducts and induction of mutagenic effects in rats following 4 weeks inhalation exposure to ethylene oxide as a basis for cancer risk assessment. **Mut. Res.**, n. 447, p. 27-48, 2000.

SMOLIAR, V. Kinetics of the micronuclei of the kidney after irradiation and unilateral nephrectomy. Effect of cystamine **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem Med.**, v. 16, n. 3, p. 227-31, 1969.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; LAMBERTINI, L.; LAURIOLA, M.; PADOVANI, M; MALTONI, C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 982, p. 87-105, 2002.

SQUIRE, R. A.; CAMERON, L. L. An analysis of potential carcinogenic risk from formaldehyde. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 4, p. 107-129, 1984.

STEWART, P. A.; BLAIR, A. Women in the formaldehyde industry: their exposures and their jobs. **J. Occup. Med.**, v. 36, n. 8, p. 918-923, 1994.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. **Cancer Lett.**, v. 22, p. 241-253, 1984.

STRAFFON, L. H.; HAN, S. S. The effect of formocresol on hamster connective tissue cells, a histologic and quantitative radioautographic study with proline-Ha. **Archs. Oral. Biol.**, v. 13, p. 271-288, 1968.

SURUDA, A.; SCHULTE, P.; BOENIGER, M.; HAYES, R. B.; LIVINGSTON, G. K.; STEENLAND, K.; STEWART, P.; HERRICK, R.; DOUTHIT, D.; FINGERHUT, M. A. Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 2, p. 453-460, 1993.

SWENBERG, J. A. et al. Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor. **Cancer Res.**, v. 40, p. 3398-3402, 1980.

THOMPSON, K. S.; SEALE, N. S.; NUNN, M. E.; HUFF, G. Alternative method of hemorrhage control in full strength formocresol pulpotomy. **Pediatr. Dent.**, v. 23, n. 3, p. 217-222, 2001.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.**, n. 271, p. 69-77, 1992.

TUNCA, B.; EGELI, U.; AYDEMIR, N.; CECENER, G.; BILALOGLU, R. Investigation of the genotoxic effect in bone marrow of Swiss albino mice exposed long-term to pyrimethamine. **Teratogen. Carcinog. Mutagen.**, v. 22, p. 393-402, 2002.

VAN AMERONGEN, W. E.; MULDER, G. R.; VINGERLING, P. A. Consequences of endodontic treatment in primary teeth. Part 1. a clinical and radiographic study of the influence of formocresol pulpotomy on the life-span of primary molars. **J. Dent. Child.**, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 364-370, 1986.

VON LEDEBUR M; SCHMID W The micronucleus test. Methodological aspects. **Mutat Res.**, v. 19, n. 1, p. 109-17, 1973.

ANEXOS

ANEXO 1



APRESENTAÇÃO:

O produto é apresentado na forma líquida, acondicionado em vidros de 10ml.
M.S.: 10298550021

INDICAÇÃO:

Utilizado no tratamento conservador dos dentes decíduos e em alguns casos específicos de dentes permanentes.

COMPOSIÇÃO:

Formaldeído; Orto-Cresol; Glicerina Bi-distilada e Álcool Etilico 96°.

INFORMAÇÃO TÉCNICA:

A formulação do FORMOCRESOL obedece padrões orientados pelas pesquisas atuais, sendo portanto, mais diluído que a composição padrão de Buckley, mas tendo a mesma eficácia ou superior e uma maior compatibilidade biológica.

Sua função é fixar as polpas vivas, mantendo-as inertes e possibilitando a conservação do dente decíduo até uma época próxima da queda fisiológica (pulpotomia). Possui ação antibacteriana potente pela ação de seus componentes, o que justifica seu uso em curativos de demora em tratamentos endodônticos.

INSTRUÇÕES DE USO:

- a) Anestesia e isolamento do dente, de preferência com isolamento absoluto;
- b) Remoção de todo o tecido cariado;
- c) Remoção do teto da câmara pulpar;
- d) Pulpotomia (remoção da polpa coronária);
- e) Hemostasia e lavagem da câmara pulpar com TERGIPOL ou TERGENCAL;
- f) Aplicação de uma bolinha de algodão embebida com FORMOCRESOL, sobre os cotos pulpares, devendo ficar por 5 a 7 minutos até que promova hemostasia;
- g) Remover o algodão e colocar uma camada de ÓXIDO DE ZINCO e EUGENOL e outra com cimento Fosfato de Zinco. Depois restaura-se com amálgama ou coroa de aço.

CONSERVAÇÃO:

O produto deve ser conservado em local seco, ao abrigo do calor e da ação da luz solar.

- Não utilizar produtos fora do período indicado de validade -

"MANTER O PRODUTO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS"

USO EXCLUSIVO DO CIRURGIÃO DENTISTA

BIODINÂMICA QUÍM. E FARM. LTDA.
C.N.P.J.: 84.833.888/0001-33 - Indústria Brasileira - R. Ronat Walter Sodré, 4350 - Parque Industrial IV
86200-000 - Iraporã - Paraná - Brasil - Fone +55 43 258-4636 - Fax +55 43 258-5510
Farm. Resp.: Giandra C. Cavassani - CRF/PR - 5806
biodinamica@biodinamica.com.br - www.biodinamica.com.br

SAC - sac@biodinamica.com.br + 55 (43) 258-4636

EM 000013 - Rev. 03 - 11/03/02

ANEXO 3

Tabela: Código das Lâminas

01	02	03	04	05	06	06	08	09
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33	34	35	35
37	38	39	40	41	42	43	44	45
46	47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60	61	62	63
64	65	66	67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81
82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99
101	102	103	104	105	106	107	108	109
201	202	203	204	205	206	207	208	209
301	302	303	304	305	306	307	308	309
401	402	403	404	405	406	407	408	409
501	502	503	504	505	506	507	508	509
510	511	512	513	514	515	516	517	518

ANEXO 5



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 149/03

Fortaleza, 05 de junho de 2003

Protocolo COMEPE n° 79/03

Pesquisador responsável: Maria Emília Santos Pereira Ramos

Dept°./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFC

Título do Projeto: "Estimativa do potencial genotóxico e mutagênico do formocresol utilizado na prática odontológica"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 29 de maio de 2003.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta de Miriam Parente Monteiro.

Dra. Miriam Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/IIUWC/UFC

ANEXO 6

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Avaliação do potencial genotóxico do formocresol utilizado na prática odontológica”

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todas as dúvidas sobre a pesquisa sejam esclarecidas.

Devido ao fato de que algumas substâncias podem alterar o DNA das células do homem tornando-o mais propenso a desenvolver alguma forma de câncer, torna-se importante e necessária a avaliação dessas substâncias quanto aos seus possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos em um sistema-teste *in vitro*. Ou seja, o potencial dessa substância causar dano (quebra) no DNA das células

A presente pesquisa objetiva avaliar o potencial de duas substâncias, o Formocresol e o Paramonoclofenol Canforado, que são substâncias usadas pelos dentistas, quanto a possibilidade de alterar o DNA dos linfócitos, que são células que fazem parte do sangue. Para isso, será utilizado o Teste Cometa, um dos meios mais utilizados em todo o mundo para avaliar lesões no DNA.

Estudo desse tipo poderá contribuir para o conhecimento dos efeitos dessas substâncias que são usadas rotineiramente na prática odontológica, quanto a possibilidade de alterar o DNA das células do ser humano. Essa pesquisa se baseia em estudo experimental em que os benefícios aos voluntários serão de forma indireta, ao se verificar os efeitos mutagênicos do Formocresol.

Para a realização da pesquisa, necessitamos de sua colaboração voluntária. Você ajudaria nosso estudo doando 5 mL de sangue, que será coletado na UNIFAC (Unidade de Farmacologia Clínica), por pessoal devidamente treinado e habilitado para evitar infecções e hemorragias. A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto. No entanto, pode ocorrer uma mancha roxa no local da picada da agulha que, normalmente, desaparece de forma espontânea. Esta coleta terá como objetivo a obtenção dos linfócitos humanos, a partir do sangue total.

Para ser voluntário é condição indispensável que esteja em boa saúde, e, portanto não esteja, no momento, sob tratamento médico ou fazendo uso de medicações regulares, exceto anticoncepcionais (para mulheres).

A pesquisa será desenvolvida pela cirurgiã-dentista Dr^a. Maria Emilia S. P. Ramos, aluna do Mestrado Profissionalizante em Farmacologia Clínica, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, e pela professora Dr^a.Cláudia do Ó Pessoa, nos Laboratórios de Oncologia Experimental (LOE) do referido departamento. O material colhido será usado exclusivamente para a execução desta pesquisa, e os dados obtidos serão encaminhados para publicação em revistas especializadas e congressos, sendo mantido o sigilo e respeitando a privacidade dos seus voluntários. A qualquer momento você poderá solicitar informações sobre a pesquisa.

Você poderá entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa nos seguintes endereços:Dr^a. Maria Emilia S. P. Ramos

Av. Augusto Lopes Fontes, 615, Costa Azul, Salvador –Bahia

Telefone: 90 (xx) 75 261-4249 ou (75) 261-2794 (ligação a cobrar) ou (85) 288 82 55

Declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo conscientemente em participar da presente pesquisa, doando 5 mL de sangue.

Fortaleza, ____ de _____ de 2003

Endereço: _____

CPF: _____ Identidade: _____

Maria Emilia S. P. Ramos
Pesquisadora Responsável

ANEXO 7

TERMO DE RESPONSABILIDADE DO COORDENADOR DO PROJETO

Eu, Maria Emilia Santos Pereira Ramos professora do Departamento de Saúde, desta universidade, asseguro à CEUA/UEFS que conheço a legislação vigente e os Princípios Éticos publicados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e que concordo plenamente com suas exigências, as quais cumprirei e farei cumprir durante a vigência desta pesquisa. Confirmando que todo pessoal envolvido nesta pesquisa, leu o protocolo para pesquisa com animais e concorda em aceitar e cumprir os termos descritivos e eventuais condições colocadas pela CEUA. Declaro ainda que a infra-estrutura para a acomodação, uso e destino posterior dos animais descritos neste projeto é adequada. Estou ciente de que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade e que estarei sujeito às punições na legislação em vigor, devendo ainda comunicar imediatamente à CEUA e outras autoridades competentes qualquer acidente referente aos procedimentos dessa pesquisa.

Feira de Santana, 03 Abril de 2003

Maria Emilia S. P. Ramos
Pesquisadora