

BRUNA DOS PASSOS ZANARDI

**EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DO FORMOCRESOL NO DESENVOLVIMENTO
INICIAL DO *ZEBRAFISH*.**

Trabalho de conclusão do curso
de Odontologia da PUCRS para
a obtenção do título de cirurgião-
dentista.

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

PORTO ALEGRE

JULHO - 2013

Dedico esse trabalho aos meus pais, pois sem eles nada seria possível. Meus maiores incentivadores que batalharam junto comigo todos esses anos. Nenhum passo eu dei sozinha, vocês estiveram sempre ao meu lado. Aos meus irmãos que tantas vezes usurpados da minha presença mas não do meu amor, e que sempre torceram pela concretização deste meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus que me deu forças para suportar esses 6 anos de caminhada, meu grande amigo, companheiro na solidão. Sem ele nada é possível.

Aos meus pais, patrocinadores de sonhos. Pai, sei de todo teu esforço para manter uma filha estudando em outra cidade. Minha dívida contigo é impagável. Embora separados por uma centena de quilômetros, me sinto muito mais próxima de ti. O título mais importante que carrego comigo é o de tua filha (mãe, vale pra ti também). Mãezinha, mostrou-se a melhor amiga que eu poderia ter. Sempre muito compreensiva, sempre com uma palavra amiga me ajudando a levantar a cada tropeço dessa jornada, me fazendo acreditar na minha capacidade. Obrigada por todas as orações e por todas as vezes que secou minhas lágrimas (mesmo à distância) ou que sentiu a mesma alegria que eu até com a menor das conquistas. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus irmãos, que me apoiaram e me fizeram sentir parte da família mesmo estando longe. Em especial ao Moisés que me viu sair de casa quando tinha apenas 3 anos de idade e mesmo crescendo longe de mim me emocionou a cada reencontro e a cada despedida.

Aos meus avós que me fazem presente no dia-a-dia, sempre perguntando de mim. A felicidade que vejo em seus olhos ao me encontrar é indescritível.

Ao resto da minha família que sempre me apoiou fazendo o possível e impossível para me ajudar.

Ao mestre, e posso dizer amigo, Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber, pela paciência, confiança depositada e por toda ajuda oferecida. “Motivação é a arte de fazer as pessoas fazerem o que você quer que elas façam porque elas o querem fazer.” Obrigada por tudo, sem você esse trabalho não seria possível.

Às pessoas especiais que Deus colocou no meu caminho, Filipe Penteadado, Gisele Mendes, Aline Clemes, Camila Beltrami. Muito obrigada por colorir minha vida. Sem vocês não teria graça.

Um dia uma criança chegou diante de um pensador e perguntou-lhe: "Que tamanho tem o universo?". Acariciando a cabeça da criança, ele olhou para o infinito e respondeu: "O universo tem o tamanho do seu mundo". Perturbada, ela novamente indagou: "Que tamanho tem meu mundo?". O pensador respondeu: "Tem o tamanho dos seus sonhos".

Augusto Cury

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 METODOLOGIA.....	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
5 REFERÊNCIAS	17

RESUMO

A avaliação da citotoxicidade dos materiais odontológicos é de grande importância na Odontologia. O Formocresol, que contém formaldeído na sua composição é um medicamento utilizado há muitos anos para desinfecção do canal radicular por sua capacidade antimicrobiana. Ele tem sido questionado sobre seus possíveis efeitos citotóxicos nos tecidos conectivos, distribuição sistêmica após pulpotomias, bem como o possível potencial carcinogênico do formocresol. A escolha do *Zebrafish* como modelo experimental se deve ao seu desenvolvimento externo e embrião transparente, grande capacidade de absorver moléculas presentes no meio e a facilidade de sua utilização na avaliação do efeito de tratamentos. O objetivo é caracterizar os potenciais efeitos embriotóxicos da exposição sistêmica ao formocresol durante o desenvolvimento inicial do *Zebrafish*. Os embriões utilizados são oriundos de acasalamentos prévios no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso da PUCRS. Os aquários receberam água filtrada por osmose reversa, livre de bactérias e fungos sendo monitorada a temperatura e o pH. Os peixes foram submetidos a um ciclo claro/escuro e receberam dieta balanceada. Os óvulos fecundados foram separados e utilizados no decorrer do experimento. Os embriões foram mantidos em placas de 6 poços até 7 dpf, totalizando 7 grupos (N=20), sendo 2 controles e outros 5 que receberam diferentes doses de formaldeído (0,1mg/L, 1mg/L, 10mg/L, 100mg/L, 300mg/L). Neste piloto foi analisada a mortalidade e a taxa de eclosão. Concluímos que houve alteração no padrão de eclosão dos embriões, assim como foi definida a dose letal do formaldeído.

DESCRITORES: Pulpotomia, Odontopediatria, Formaldeído, Toxicidade de drogas.

ABSTRACT

The evaluation of the cytotoxicity of dental materials is of great importance in Dentistry. The Formocresol containing formaldehyde in its composition is a drug used for many years for the disinfection of the root canal for its antimicrobial properties. It has been questioned about their possible cytotoxic effects in connective tissues, systemic distribution after pulpotomy and possible carcinogenic potential of formocresol. The choice of *Zebrafish* as an experimental model is due to its external development and transparent embryos, large capacity of absorbing molecules present in the medium and the ease of its use in the assessment of treatment effects. The goal is to characterize the potential embryo-toxic effects of systemic exposure to formocresol during early development of *Zebrafish*. The embryos used are from previous matings in the Laboratory of Biology and Development of the Nervous System PUCRS. The aquariums have received filtered water by reverse osmosis, free of bacteria and fungi being monitored temperature and pH. The fish were exposed to a light / dark cycle and fed a balanced diet. The embryos were separated and used throughout the experiment. The embryos were maintained in 6-well plates up to 7 dpf, totaling 7 groups (N = 20) and controls and other two to five received different doses of formaldehyde (0.1 mg / L, 1 mg / L, 10mg / L 100mg / L, 300mg / L). In this pilot was analyzed mortality and hatching rate. We conclude that there was a change in the pattern of hatching of embryos, as well as defined the lethal dose of formaldehyde.

KEYWORDS: Pulpotomy, Pediatric Dentistry, Formaldehyde, Drug Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

A terapia pulpar na dentição decídua inclui algumas opções dependendo do grau de saúde pulpar e seu estágio de inflamação. ¹ O principal objetivo do tratamento pulpar é manter a integridade e saúde dos dentes e dos tecidos de suporte. ²

Durante anos, a pulpotomia tem sido o tratamento padrão para lesões cariosas profundas onde a completa remoção da cárie resulta na exposição pulpar, ³ tal exposição também pode ocorrer em casos de trauma. A polpa coronária infectada ou inflamada é amputada, mantendo o tecido pulpar radicular vital e não infectado. ⁴

Historicamente, o formocresol tem sido o medicamento de escolha para a pulpotomia de dentes decíduos ³ procurando manter a polpa radicular em condições de saúde, permitindo que o ciclo biológico de reabsorção radicular se processe naturalmente. ^{4, 5, 6, 7} O uso do formocresol como medicamento pulpar se tornou popular no início dos anos 1900, quando Buckley publicou pela primeira vez seu método de usar partes iguais de tricresol e formalina. ⁸ Embora os procedimentos e formulação tenham mudado desde a primeira publicação, o formocresol manteve-se popular como um medicamento para o tratamento da polpa vital. Uma pesquisa realizada em 2005 por Dunston et al. concluiu que 81% dos odontopediatras ainda fazem uso do formocresol ou do formocresol diluído, 18% utilizam o sulfato férrico, e somente 1% usam algum outro medicamento ou técnica para pulpotomias de dentes decíduos. ⁹

Atualmente, o formocresol diluído, na proporção 1:5 tem sido o mais utilizado. ¹⁰ Suas apresentações comerciais consistem de 19% de formaldeído, 35% de cresol, 15% de glicerina (veículo) e 100cc de água destilada q.s.p. Destes componentes, a glicerina, a água destilada e o cresol não interferem na eficácia do produto. No entanto, o formaldeído é um gás estabilizado a 37% em solução aquosa, extremamente volátil, com ponto de ebulição menor que a água, podendo, desta forma, alterar a ação do medicamento quando a embalagem do produto é deixada aberta. ¹¹

A pulpotomia seguida do uso do formocresol é indicada nas Diretrizes Clínicas em Odontologia Pediátrica do Reino Unido e pela Academia Americana de Odontopediatria (AAPD).^{2, 12}

Segundo as diretrizes clínicas do Reino Unido, na técnica da pulpotomia em dentes decíduos, devemos aplicar durante 5 minutos sobre o remanescente pulpar uma bolinha de algodão contendo solução de Formocresol de Buckley a 20% para conseguir a fixação superficial do tecido.¹²

Bowen, et al., avaliaram as atitudes de odontopediatras e dentistas generalistas frente à terapia pulpar de dentes decíduos, através de um questionário eletrônico. 1.259 profissionais responderam o questionário, o qual o caso clínico de uma menina de 4 anos com cárie no segundo molar superior decíduo, sem história de dor em que a remoção completa do tecido cariado possivelmente resultaria em exposição pulpar, com uma radiografia periapical anexada. 500 dentistas (68% dos participantes), num total de 738 responderam que o Formocresol seria o material de escolha para a pulpotomia.³

O Formocresol apresenta atividade antibacteriana nos canais radiculares mesmo sendo usado apenas na câmara pulpar.^{13, 14} Entretanto ainda há questionamentos quanto a sua utilização devido a uma possível distribuição sistêmica, com provável potencial citotóxico, mutagênico e carcinogênico.^{10, 15, 16} O Formaldeído, um componente básico do Formocresol, é a substância considerada com probabilidade carcinogênica pela International Agency for Research on Cancer Health, Canadá.¹⁷

Estudos têm demonstrado uma propriedade de fixação tecidual adequada, proporcionando sucesso clínico e radiográfico. Porém, muito interesse tem surgido sobre o potencial mutagênico e carcinogênico de produtos contendo formaldeído, dos efeitos tóxicos do formocresol, e da possível difusão dessa substância para os tecidos sistêmicos e circunvizinhos do dente. Estudos em animais têm confirmado que o formocresol aparece sistematicamente após o seu uso em pulpotomias e que injúria celular pode ocorrer nos tecidos sistêmicos.¹⁸

A partir da década de 70, começou-se a especular sobre os efeitos do formocresol sobre o organismo e vários estudos mostraram sua citotoxicidade; alterações no sucessor permanente; sua absorção e distribuição sistêmica e sua

excreção lenta; a formação de lesões císticas de caráter imunogênico e a aceleração do processo de rizólise dos dentes decíduos. Também se observou que não havia controle da penetração do formocresol no tecido pulpar radicular e que neste, sempre havia certo grau de inflamação, o que geralmente se estendia apicalmente.¹⁹

O tecido pulpar é “fixado” pelo formocresol e responde através de zonas de necrose e inflamação. Pode-se dizer que, embora o formocresol tenha propriedades bactericidas, também tem propriedades irritantes ao tecido pulpar. Desta forma, os altos índices de sucesso clínico alcançados com a técnica do formocresol possivelmente escondem uma inflamação crônica silenciosa no remanescente pulpar radicular.²⁰

O potencial imunogênico, tóxico, mutagênico e carcinogênico desse medicamento e o conseqüente risco potencial de seu uso para a saúde humana já são bastante conhecidos e inclusive reconhecidos por várias instituições, dentre elas a Organização Mundial de Saúde.²¹

Em junho de 2004, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) classificou o formaldeído (um componente da solução de formocresol de Buckley) como substância carcinogênica, com suficientes evidências de desenvolvimento de câncer nasofaríngeo em humanos.²² Um fator importante seria o grau de efeito acumulativo para os profissionais de odontologia, que também realizam pulpotomias e expõem-se ao formaldeído.

Muitas preocupações a respeito da segurança quanto ao uso do formocresol tem aparecido na literatura odontológica há mais de 20 anos.²³ Os maiores questionamentos têm sido com o principal componente do formocresol, o formaldeído, pois apesar da diluição 1:5 estar especificada como medicamento de escolha nas escolas de graduação, a maioria (78%) dos odontopediatras americanos faz a utilização do formocresol “puro” nas pulpotomias de dentes decíduos. Apenas 2% dos odontopediatras americanos utilizam soluções diluídas do medicamento.²⁴

As opiniões são conflitantes entre os Odontopediatras Britânicos no que diz respeito ao uso contínuo do formocresol. No entanto, de uma forma geral há uma

concordância de que o uso do formocresol se tornará cada vez mais problemático e pode realmente conduzir a uma mudança na prática clínica. Nos Guidelines destacam-se as preocupações atuais quanto à exposição nas pulpotomias ao formaldeído, e sugerem-se o uso de novos materiais também eficazes, como Sulfato Férrico e MTA (Agregado Trióxido Mineral).²⁵

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito embriotóxico do formocresol monitorando as taxas de mortalidade até 7 dpf e de eclosão até 4 dpf em larvas tratadas com formaldeído.

2 METODOLOGIA

Foram utilizados embriões obtidos de cruzamentos de peixes adultos, da espécie *Danio rerio* wild-type com mais de 7 meses de vida oriundos de acasalamentos prévios no LBDSN (Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso da PUCRS).

Devido à capacidade de absorver as substâncias adicionadas ao seu meio, a complexidade típica de vertebrado e a transparência dos embriões e larvas durante os estágios de formação do sistema cardiovascular, o *Zebrafish* tem sido apontado como um ótimo modelo animal para estudos de desenvolvimento e embriotoxicidade. Seu desenvolvimento embrionário completa-se em até 72 horas pós-fertilização (hpf), quando o ovo eclode dando origem a uma larva,²⁶ o que facilita o acompanhamento da evolução dos processos em tempo real.

Os peixes adultos são mantidos num sistema automatizado de produção de embriões em massa (MEPS, Tecniplast) no qual os animais são acasalados conforme Westerfield.²⁷

Todos os aquários possuem água filtrada por osmose reversa, livre de bactérias e fungos, e as concentrações de amônia, nitritos, nitratos e cloro adequadas, assim como monitoramento da temperatura (28 °C + ou - 2°C) e pH (7,0 a 7,5). Os animais são submetidos a um ciclo claro/escuro de 14/10 horas respectivamente, e recebem ração flocada comercial e artêmia salina, fornecendo, assim, uma dieta balanceada.²⁸

Os animais são acasalados conforme Westerfield,²⁸ em um aquário de encaixe onde as fêmeas e os machos são colocados em um mesmo ambiente, mas mantidos separados por uma divisória transparente durante o período escuro. Ao início do período claro, a divisória é removida deixando os animais livres para acasalar. Os óvulos fecundados retidos na grade presente no fundo do aquário de encaixe são separados para posterior utilização no decorrer do experimento.

Após a coleta os embriões são mantidos em placas de 6 poços (20 embriões por poço) até o término dos tratamentos com água filtrada por osmose reversa e enriquecida com sal (*Instant Ocean*) para os respectivos tratamentos. Em todos os estágios a temperatura e a luminosidade são controladas de acordo com os parâmetros citados acima para os adultos.

Os animais são eutanizados, após o término dos experimentos (10dpf) de acordo com procedimentos indicados pelo *Canadian Council on Animal Care* em relação ao uso de peixes em pesquisa, testes toxicológicos e ensino²⁹ e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal,³⁰ através de overdose de anestésico tricaina (MS-222), de acordo com Westerfield.²⁸

Para os tratamentos, os embriões considerados viáveis são higienizados e mantidos submersos em água preparada conforme Westerfield²⁸ em estufa BOD. Os embriões dos diferentes grupos são mantidos em placas de cultivo celular de 6 poços em número de 20 embriões por poço para que seja então administrado o tratamento com formaldeído em água do aquário.

Foi realizado um piloto com animais controle e tratados com formaldeído. Segundo Milnes, a dose estimada de formaldeído em uma pulpotomia, assumindo a diluição de 1:5 de formocresol é de aproximadamente 0,02 a 0,10mg.³¹

Neste estudo utilizamos apenas o formaldeído a 37%.¹¹ O Formaldeído é a substância considerada com probabilidade carcinogênica pela International Agency For Research on Cancer Health, Canadá.¹⁷ Outra razão que nos fez isolar o formaldeído é o fato da fórmula que é comercializada possuir como veículo a glicerina que não pode ser dissolvida na água.

Baseando-se neste dado, as doses escolhidas para o teste piloto foram: 0,1mg/L, 1mg/L, 10mg/L, 100mg/L, 300mg/L. Neste piloto os animais foram subdivididos em grupos tratados por 7 dias após a fertilização (dpf), totalizando 7

grupos (n= 20), sendo dois deles do grupo controle que não recebeu tratamento nenhum. O meio de tratamento foi renovado diariamente para garantir o efeito do formaldeído. Durante o piloto foram observadas taxas de mortalidade e eclosão.

Todos os tratamentos foram realizados dissolvendo o formaldeído nas doses supracitadas em água obtida após filtração por osmose reversa e reequilibrada ionicamente por adição de sais (Instant Ocean) a fim de proporcionar as condições ideais para desenvolvimento embrionário e larval.²⁸

Os animais tratados e controles foram mantidos em condições controladas e alimentados conforme as recomendações para cada etapa de desenvolvimento.³² Os embriões foram colocados em placas de 6 poços e seu período de desenvolvimento controlado. Estes foram mantidos a uma temperatura constante de 28 °C, em estufa BOD, com período claro/escuro de 14/10 horas respectivamente.

Para a análise da mortalidade, as larvas foram observadas até 7 dpf em um estereomicroscópio. A eclosão também foi observada em um estereomicroscópio até 4 dpf. As contagens foram feitas antes da troca diária dos tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes modelos animais vêm sendo adaptados para estudos que possam, ao mesmo tempo, diminuir o custo e ainda manter uma complexidade de sistemas que permita a extrapolação dos achados para outros animais e humanos.^{33, 34, 35} O teleósteo *Danio rerio*, mundialmente conhecido como *Zebrafish* foi descrito primeiramente por Francis Hamilton em 1822,³⁵ pertencente à família Cyprinidae, uma das mais ricas em representantes entre os vertebrados, esta espécie tem distribuição geográfica no sul e sudeste da Ásia.

A fertilização e desenvolvimento exclusivamente externos de ovos relativamente grandes (em torno de 0,7 milímetros de diâmetro) e transparentes facilitam a observação. Seu desenvolvimento embrionário completa-se em até 72 horas pós-fertilização (hpf), quando o ovo eclode dando origem a uma larva, o que facilita o acompanhamento da evolução dos processos em tempo real. Outras

vantagens são a possibilidade de estudos genéticos em grande escala enquanto mantém a complexidade típica de um vertebrado, somadas a fácil manipulação e manutenção quando comparado aos modelos de vertebrados tradicionais. Por esses motivos, o *Zebrafish* vem se estabelecendo como vantajoso modelo animal para pesquisar a avaliação dos efeitos embriotóxicos do formocresol.³⁴ Este medicamento é muito utilizado em pulpotomias de dentes decíduos.

A anatomia dos dentes decíduos se assemelha de forma geral aos dentes permanentes, diferindo desses por possuir as camadas de esmalte e dentina mais delgadas e menos calcificadas que a dos permanentes, o volume pulpar maior, aumentando a possibilidade, na evolução do processo carioso de exposição pulpar.¹

A configuração interna dos dentes decíduos composta de inúmeros canais secundários, acessórios, dispostos em toda área radicular, nesta região são particularmente numerosos e podem ser um fator de desencadeamento de problemas endo-periodontais, uma vez que o número de forames nesta região é grande. Por estes motivos, na escolha de medicamentos para tratamento pulpar de dentes decíduos, devem-se levar em conta os pontos mencionados, pois a difusão destes podem causar danos à região, principalmente quando as drogas selecionadas são muito irritantes, como o caso do Formocresol em sua composição clássica ou mesmo diluída.¹

. A fórmula original do Formocresol de Buckley requeria partes iguais de formaldeído e cresol, todavia a fórmula que atualmente está sendo empregada é a diluída 1:5, segundo Berger, no qual suas apresentações comerciais consistem de formaldeído, cresol, glicerina e água destilada q.s.p..¹¹

O Formocresol ainda é considerado, por alguns autores, o material indicado para pulpotomia de dentes decíduos porque apresenta capacidade de fixar, desvitalizar e aliviar a dor mesmo em polpa inflamada, porém, a qualidade desse tecido não é a mais aceitável.^{22,36}

De acordo com os autores Massler et al.³⁷, Emmerson et al.³⁸, Doile et al.³⁹, Villamarim et al.,⁴⁰ em suas pesquisas verificaram que, microscopicamente, as respostas pulpares de dentes decíduos tratados com formocresol mostraram a primeira camada, logo abaixo do medicamento, de tecido necrótico, fixado e acidófilo (fixação), a camada seguinte corada palidamente (atrofiada) e uma camada de

concentração de células inflamatórias e, finalmente, uma quarta camada de tecido normal. As camadas de fixação e inflamação são mais amplas, de acordo com o tempo em que o medicamento ficou em contato com a polpa.

Segundo as diretrizes clínicas em Odontologia Pediátrica no Reino Unido, devemos aplicar com uma bolinha de algodão o formocresol diluído por cerca de 5 minutos sobre o remanescente pulpar pra se conseguir a fixação do tecido superficial.

Muito interesse tem surgido sobre o potencial mutagênico e carcinogênico de produtos contendo formaldeído, dos efeitos tóxicos do formocresol, e da possível difusão desta substância para os tecidos sistêmicos e circunvizinhos do dente. Em contraste com outros aldeídos, o formaldeído é uma molécula pequena que penetra através do canal radicular. Estudos em animais têm confirmado que o formocresol aparece sistematicamente após seu uso em pulpotomias e que injúria celular pode ocorrer nos tecidos sistêmicos.¹⁸

Analisando os resultados deste trabalho (Figura 1), podemos observar que há um padrão na sobrevivência, porém em determinado momento todas as larvas morrem mostrando que o formocresol possui toxicidade. Tendo em vista uma criança que tenha muitas necessidades odontológicas, com vários dentes que necessitem de pulpotomia esse dado é muito preocupante pois a dose de 300mg/L é letal. As concentrações foram baseadas na quantidade de formocresol presente em uma pulpotomia quando utilizando o Formocresol diluído 1/5. Porém em muitos lugares, a maioria dos Odontopediatras continua utilizando o formocresol de Buckley (partes iguais de formaldeído e cresol). No Brasil, o medicamento para pulpotomia ainda utilizado em Unidades de Saúde pública é o tricresol formalina. O Formocresol e o Tricresol Formalina possuem a mesma composição química (formaldeído e cresol), porém, apresentam, em suas formulações, concentrações diferentes de formalina: tricresol formalina em torno de 90% e formocresol, de 19 a 43%.⁴¹

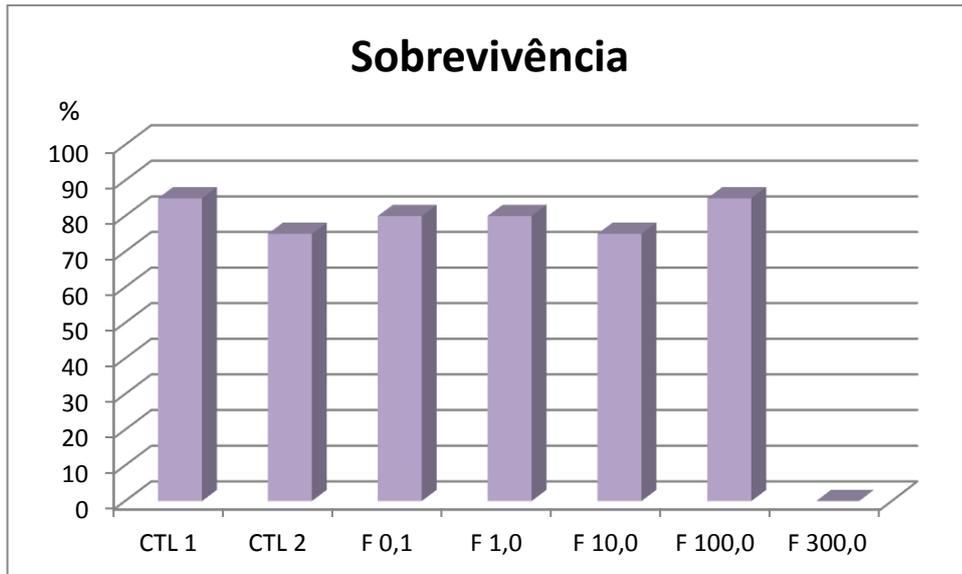


Figura 1 - Mostra um padrão um padrão de mortalidade, porém nenhuma larva sobreviveu à concentração de 300 mg/L.

Observando-se os resultados da taxa de **eclosão (Figura 2)**, podemos observar que há uma aceleração nesse processo nas concentrações de 1mg/L e 100mg/L. A antecipação da taxa de eclosão é preocupante pois foge do padrão e mostra que há sim uma alteração no desenvolvimento embrionário do Zebrafish.

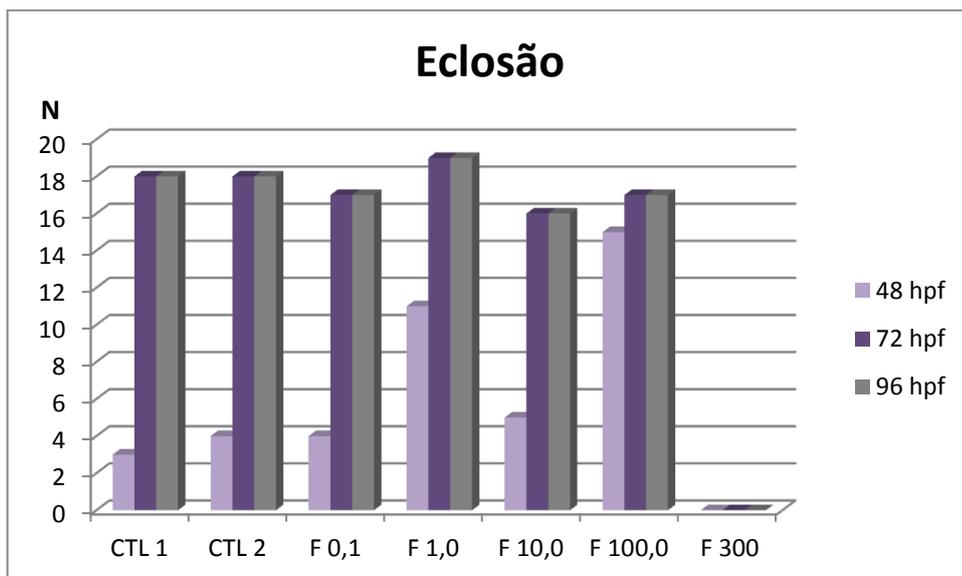


Figura 2 - Há uma alteração no padrão de eclosão em 48 hpf nas concentrações de formocresol de 1 mg/L e 100 mg/L.

Um estudo realizado por Hill et al.,⁴² avaliou a citotoxicidade do formocresol através de sua ação sobre cultura de linhagens celulares. O formocresol causou fixação destas células, e este resultado era esperado pelo fato deste medicamento ser conhecido como um fixador tecidual. O formocresol e seus vapores foram tóxicos para as células. As células tornaram-se atóxicas, e em menor número nos poços expostos diretamente ao formocresol e nos poços controle expostos aos vapores do formocresol. Para surpresa dos pesquisadores, uma diminuição nos efeitos citotóxicos do formocresol não foi observada nas diferentes diluições (10 e 100 vezes) do formocresol 0,75%, indicando que as pequenas concentrações são exatamente tão citotóxicas quanto as maiores concentrações.

Este estudo, embora seja apenas um teste piloto, mostrou que nossa hipótese parece verdadeira e que novos trabalhos devem ser conduzidos nesta linha de pesquisa.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseando-se nos resultados obtidos até agora, podemos concluir que sim o formaldeído presente no formocresol é citotóxico e causa alterações no padrão de eclosão das larvas de *Zebrafish*. Porém, esta pesquisa ainda pretende avaliar mais a fundo o potencial embriotóxico, teratogênico e apoptótico da exposição sistêmica do formocresol no desenvolvimento inicial do *Zebrafish*.

Este teste piloto foi importante para definirmos as doses a serem testadas assim como o descobrimento da dose letal deste medicamento. Esta dose é considerada alta, porém o que devemos levar em consideração é o efeito cumulativo desta droga, tanto para o profissional quanto para uma criança com muitas necessidades odontológicas que necessite de mais de uma pulpotomia.

O Formocresol é capaz de controlar uma infecção de origem endodôntica, porém pode causar irritação e/ou destruição dos tecidos vivos locais como também se espalhar sistemicamente (uma vez que não temos controle da sua penetração). Com base nesses achados e pelo que é descrito na literatura, os efeitos tóxicos e sistêmicos do formaldeído colocam em dúvida sua viabilidade na prática odontológica.

Em virtude destes fatos, outros materiais devem ser considerados para a realização desta técnica como o hidróxido de cálcio, o sulfato férrico e mais recentemente o MTA (Agregado Trióxido Mineral).

5 REFERÊNCIAS

1. GUEDES-PINTO AC. Tratamento endodôntico em dentes decíduos. In: Guedes-Pinto AC. Odontopediatria. 7ª Ed. São Paulo: Ed. Santos, 2003.970 p.
2. American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD). Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth – Reference manual. 11/12; 33(6):212-19
3. BOWEN LJ, MATHU-MUJU KR, NASH DA, CHANCE KB, BUSH HM, LI HF. Pediatric and General Dentists' Attitudes toward Pulp Therapy for Primary Teeth. *Pediatr Dent*. 2012 May-Jun; 34(3):210-5.
4. GUEDES-PINTO AC. Tratamento Endodôntico em dentes decíduos. São Paulo: Santos, 1997. P.535-55.
5. GUELMANN M, FAIR J, TURNER C, COURTS FJ. The success of emergency pulpotomies in primary molars. *Pediatr Dent* 2002; 24(3):217-20.
6. HOLAN G, EIDELMAN E, FUCKS A. Long-term evaluation of pulpotomy in primary molars using mineral trioxide aggregate or formocresol. *Pediatr Dent* 2005; 27(2):129.
7. LLEWELYN DR. The pulp treatment of the primary dentition. *Int J Paediatr Dent* 2000; 10:248-52.
8. BUCKLEY JP. The chemistry of pulp decomposition, with a rational treatment for this condition and its sequelae. *Am Dent J* 1904;3:764-71
9. DUNSTON B, COLL JA. A survey of primary tooth pulp therapy as taught in U.S. dental schools and practiced by Diplomates of the American Board of Pediatric Dentistry. *Pediatr Dent* 2008;30:42-8
10. YOON RK, CHUSSID S, DAVIS MJ, BRUCKMAN KC. Preferred treatment methods for primary tooth vital pulpotomies. A survey. *N Y State Dent J* 2008;74(2):47-9.
11. STONA P, POLETTO VC, WEBBER JBB. Análise Química do Formocresol Após Simulação de Uso em Clínica. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2009 maio-agosto ;9(2):155-159.
12. RODD HD, WATERHOUSE PJ, FUKS AB, FAYLE SA, MOFFAT MA. UK National Clinical Guidelines in Pediatric Dentistry. *Int J Paediatr Dent* 2006; 16(1);15-23.

13. CAMBRUZZI JV, GREENFELD RS. Necrosis of crestal bone related to the use of excessive formocresol medication during endodontic treatment. *J Endod* 1983; 9(12); 565-7.
14. LLEWELYN DR. The pulp treatment of the primary dentition. *Int J Paediatr Dent* 2000; 10:248-52.
15. AGAMY HÁ, BAKRY NS, MOUNIR MMF, AVERY DR. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotted primary teeth. *Pediatr Dent* 2004; 26(4):302-9.
16. CAETANO SHG, SANDRINI JC. Novas tendências da pulpotomia de dentes decíduos. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê* 2000; 3(15):352-61.
17. Agency for Research on Cancer Health, Canadá.
18. HILL S D, BERRY CW, SEALE NS, KAGA M. Comparison of antimicrobial and cytotoxic effects of glutaraldehyde and formocresol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991; 71, 89-95.
19. TOLEDO OA. *Odontopediatria – Fundamentos para a prática clínica*. 2. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1996.
20. HANNAH DR. Glutaraldehyde and calcium hydroxide—a pulp dressing material. *Br Dent J.*, London. 1972; 132:227-231.
21. LEWIS B. Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. *J. Clin. Pediatric. Dent.*, 1998; 22(2),167-177.
22. WATERHOUSE PJ, NUNN JH, WHITWORTH JM. An investigation of the relative efficacy of Buckley's formocresol and calcium hydroxide in primary molar vital pulp therapy. *Br Dent J.* 2000; 188:32-6.
23. LEWIS BB, CHESTNER SB. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. *J Am Dent Assoc*, 1981; 103(3):429–34.
24. KING SRA, MCWHORTER AG, SEALE NS. Concentration of formocresol used by pediatric dentists in primary tooth pulpotomy. *Pediatr Dent.* 2002; 24(2):157–9.
25. SRINIVASAN V, PATCHETT CL, WATERHOUSE PJ. Is there life after Buckley's Formocresol? Part I – a narrative review of alternative interventions and materials. *Int J Pediatr Dent* 2006 Mar; 16(2):117–27.
26. ZARZAR P A, ROSENBLATT A, TAKAHASHI CS, TAKEUCHI PL, COSTA JÚNIOR LA. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study. *J Dent* 2003 Sep; 31(7):479-85.

27. WESTERFIELD, Monte. The Zebrafish book. A guide for the laboratory use of Zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press, 2000. Disponível em: <http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html> Acesso em: 17 de abril de 2012.
28. THISSE C, ZON L. Organogenesis-Heart and Blood Formation from the Zebrafish point of view. *Science*. 2002;295: 457-462.
29. CCAC. Canadian Council on Animal Care in science, 2004. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Education/DFO/3_Euthanasia_of_Finfish.pdf> Acesso em 20 de maio de 2012.
30. KIMMEL CB, BALLARD WW, KIMMEL SR, ULLMANN B, SCHILLING TF. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental dynamics*. 1995; 203:253-310.
31. MILNES A R. Is formocresol obsolete? A fresh look at the evidence concerning safety issues. *J Endod*, 2008; 34 suppl: S40–S46.
32. DAVID A, PANCHARATNA K. Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of Zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Applied Toxicology*. 2009; 29: 597-602.
33. ZON LI, PETERSON RT. *In Vivo Discovery in the Zebrafish*, 2005; 4:35-44.
34. LIESCHKE GL, CURRIE PD. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews*. 2007; 8:353-367.
35. SPENCE R, GERLACH G, LAWRENCE C, SMITH C. The behavior and ecology of the Zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2008;83(1):13-34.
36. ABDO RCC, PAVARINI A, LIMA JE, CATANZARO-GUIMARÃES SA, GARCIA RB. Effects of buckley's original formocresol on pulpar and periapical tissues in the deciduous teeth of dogs – histological study. *Ars Curandi Odontol* 1979 Sep; 6(6): 22-32.
37. MASSLER M. & MANSUKHANIN. *Effects of formocresol of the dental pulp*. *J. Dent. Child.*, 1959; 26 (4): 277-97.
38. EMMERSON CC, MIYAMOTO E, SWEET CA, BHATIA HL. Pulp changes following formocresol applications on rat molars and human primary teeth. *J. S. Calif. Dent. Ass.*, 1959 sept.; 27 (9): 309-23.
39. DOYLE WA, MCDONALD RE, MITCHELL DF. Formocresol versus calcium hydroxide in pulpotomy. *J. Dent. Child*. 1962; 29 (2): 86-97.
40. VILLAMARIM J C. Efeitos do Formocresol diluído e sua associação a um agente anti-inflamatório sobre os tecidos pulpar e periapical em dentes decíduos de cão, estudo histológico. *Ars Curandi, Odont. dez/ jan*, 1981; 7 (9): 414-18.

41. SIQUEIRA JR JF, LOPES HP. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p. 397-426.
42. HILL SD, BERRY CW, SEALE NS, KAGA M. Comparison of antimicrobial and cytotoxic effects of glutaraldehyde and formocresol. Oral Surg Oral Med Oral Pathol (Dallas). 1991;71:89-95.