

Comparación mutagénica y genotóxica de formocresol, cresol, formaldehído y glutaraldehído

Dra. Ma. Alejandra Soria Hernández,* Dra. Nelly Molina Frechero,** Dr. Israel Pérez López,* Dr. Pedro Gutiérrez Castellón,*** Dr. Eduardo de la Teja Ángeles****

RESUMEN

Antecedentes. En estomatología pediátrica la terapia pulpar en los dientes temporales utilizada con mayor frecuencia es la pulpotomía con formocresol. Por sus propiedades mutagénicas y genotóxicas, se han propuesto otros medicamentos como alternativa.

Objetivo. Demostrar el efecto adverso del formocresol y comparar su genotoxicidad con el glutaraldehído y sus componentes por separado.

Método. La evaluación se determinó con dos pruebas a corto plazo, la prueba de Ames con cepas TA 98 y Ta 100 de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica y la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de la sangre periférica del ratón. La actividad mutagénica se determinó por el programa estadístico Salanal; la frecuencia de micronúcleos y sus promedios con la prueba estadística ANOVA y Bonferroni.

Resultados. En la prueba de Ames el formocresol y el formaldehído dieron resultados positivos en un 75 % de las condiciones requeridas en este ensayo, mientras que el cresol lo dio negativo y el glutaraldehído lo dio positivo únicamente en 25 %. En la prueba de micronúcleos el formocresol y el cresol fueron negativos; el formaldehído y el glutaraldehído fueron positivos.

Conclusiones. El formocresol induce una clara mutagenicidad, pero fue negativamente genotóxico hasta en un 70% en relación con sus componentes; el formaldehído y el glutaraldehído dieron respuesta mutagénica y genotóxica, mientras que el cresol también dio resultado negativo en esta prueba.

Palabras clave: Pulpotomía, dientes primarios, pruebas de genotoxicidad, prueba de Ames, micronúcleos en sangre periférica, formocresol, cresol, formaldehído, glutaraldehído.

ABSTRACT

The mutagenic and genotoxic effects of formocresol, cresol, formaldehyde and glutaraldehyde were studied comparatively. In pediatric stomatology one of the most frequent treatment is pulpotomy with formocresol; because of its mutagenic and genotoxic properties other medications have been proposed as an alternative.

Objective. To demonstrate the adverse effect of formocresol and to compare its genotoxicity with glutaraldehyde and its components.

Method. Evaluation was done with two short-term assays Ames test with *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100, with and without metabolic activation and micronuclei frequency in peripheral blood of mice. Mutagenic activity was determined by the Salanal program; statistic Anova and Bonferroni tests were used to determine micronuclei frequency and its average.

Results. Formocresol and formaldehyde gave positive results in 75% with Ames test; cresol was negative and glutaraldehyde positive in 25%. Formocresol and cresol were negative in micronuclei test; formaldehyde and glutaraldehyde were positive.

Key words: Pulpotomy, temporary dentition, genotoxicity tests, Ames test, micronuclei in peripheral blood, formocresol, cresol, formaldehyde, glutaraldehyde.

* Laboratorio de Toxicología Genética.

** Departamento de Atención a la Salud UAM-Xochimilco.

*** Encargado de la Dirección de Investigación.

**** Jefe del Servicio de Estomatología Pediátrica. Instituto Nacional de Pediatría.

gentes Cuicuilco. México 04530 D.F. Tel: 10 84 09 00 ext. 410 E-mail: mcdmash@hotmail.com

Recibido: marzo, 2005. Aceptado: mayo, 2005.

Correspondencia: M.C.D. María Alejandra Soria Hernández. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C. Col. Insur-

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

En odontología pediátrica la pulpotomía con formocresol sigue siendo el tratamiento de elección que propuso Buckley en 1904. La pulpotomía es la amputación de la pulpa viva de la cámara coronaria que generalmente se lesiona a consecuencia de la caries dental, iatrogenias o traumatismo en los dientes primarios. La intervención va seguida de la aplicación de una torunda de algodón saturada con formocresol sobre los muñones pulpares radicales con objeto de fijar el tejido lesionado, destruir los microorganismos invasores remanentes y estimular la reparación. Este procedimiento está contraindicado cuando hay dolor espontáneo especialmente nocturno, tumefacción, presencia de fístula, sensibilidad a la percusión, movilidad patológica, hemorragia profusa en el punto de exposición, signos indicativos de que la lesión ha alcanzado la pulpa radicular.

Los componentes del formocresol son: a) Formaldehído 19%, agente activo de la mezcla, de alto poder germicida y amplio espectro; se combina con los productos de putrefacción pulpar y erradica la infección; tiene propiedades genotóxicas y mutagénicas en bacterias, hongos, líneas celulares, ratones etc¹⁻⁷. b) Cresol 35%, antiséptico y desinfectante, propiedades que favorecen el éxito de la terapia. Los datos sobre sus propiedades genotóxicas son muy limitados; aunque

se le considera inocuo o débilmente positivo en las pruebas de actividad genotóxica⁸⁻⁹. c) Glicerina 15%, facilita la difusión y solubilidad del formocresol en los tejidos circundantes; su capacidad de dañar el material genético no se menciona en los estudios publicados^{10,11}

En odontopediatría se ha propuesto el uso del glutaraldehído al 2%¹² como alternativa al uso del formocresol¹³; es un potente agente fijador antibacteriano con menor capacidad de penetración en los tejidos circundantes comparado con el formaldehído. Se ha estudiado ampliamente por sus numerosas aplicaciones en la industria científica y biomédica. Su efecto mutagénico y genotóxico se ha evaluado en diferentes sistemas de prueba sin resultados consistentes¹⁴⁻¹⁸.

La importancia del presente estudio experimental fue buscar evidencia de que la interacción de los componentes del formocresol modifica el efecto adverso que se le atribuye; además, comparar el efecto genotóxico y mutagénico entre sus componentes y el glutaraldehído.

MATERIAL Y METODOS

Sustancias químicas utilizadas

Las principales características de las sustancias estudiadas se muestran en el Cuadro 1. El formocresol y el cresol fueron donados por Degusta (México-Xoch).

Cuadro 1. Características de las sustancias de prueba

Compuesto	No. CAS	Fórmula	Peso	Solvente	Presentación	Proveedor
		Mol.	Mol.	utilizado		
formocresol 19% formal 35% cresol 15% glic p- cresol 99%	10644-5	C7H8O	108.1	glicerina/agua vol/vol glicerina/agua vol/vol	100 ml 2 Kg	Degussa Aldrich
formaldehído 37%	50-00-0	CH2O	30.03	glicerina/agua vol/vol	500ml	Sigma
glutaraldehído 25%	111-30-8	C5H8O2	100.1	glicerina/agua vol/vol	10 ml	Sigma
glycerol	56-81-5	C3H8O3	92.09	agua	500 ml	Sigma
ciclofosfamida	6055-19-2	C7H15Cl2N2O2P.H2O	279.1	agua	1 gr	Sigma

formal.-formaldehído; mol.-molecular; glic.-glicerina; vol/vol.-volumen/volumen.

Características de los animales y dieta

Se utilizaron 126 ratones machos, adultos jóvenes de la cepa Balb-c con peso aproximado de 25 a 30 g; edad promedio de 10 semanas. Se mantuvieron en cajas de polipropileno a temperatura de 23°C, humedad del 70%, con ciclos de luz oscuridad de 12 h; se les permitió libre consumo de agua y alimento. Se agruparon seis ratones por caja para cada dosis y compuesto de prueba.

Prueba de mutagénesis

Las cepas bacterianas TA98 y T100 de *Salmonella typhimurium*, fueron donadas por el Dr. B.N.Ames de la Universidad de California (Berkeley, CA, USA). Se utilizó el método de Maron y Ames (1983)¹⁹. A un tubo con 2 mL de top agar de superficie previamente calentado a 45°C, se añade 0.1 mL de cultivo bacteriano de toda la noche y 0.1 mL de los compuestos de prueba, variando las concentraciones; se homogeneiza perfectamente la mezcla y se distribuye sobre cajas de Petri que contienen agar de Vogel-Bonner. Las colonias revertantes (bacterias con capacidad de crecer en medios carentes de o con cantidades limitadas del aminoácido histidina), se contaron después de 72 h de incubación a 37°C. Si la prueba es con activación metabólica, se adiciona 0.5 mL de la fracción S9 (homogeneizado de hígado de rata al 10 %, 8mM MgCl, 33 mM KCl, 4mM NADP, 5 mM de glucosa 6 fosfato y 100 mM de buffer de fosfato de sodio pH 7.4) al tubo del top agar antes de distribuirlo sobre las cajas Petri. Se realizan cuando menos dos experimentos por cada dosis estudiada y cada una por triplicado.

Prueba de genotoxicidad

Se aplicó por vía intraperitoneal una sola dosis de las sustancias de prueba y de los controles: negativo (glicerina/agua) y positivo (ciclofosfamida). Se utilizó el método descrito por Schlegel y MacGregor (1982)²⁰. A las 48 h se tomó una muestra de sangre venosa de la cola del ratón; se realizó un frotis sobre un portaobjeto; se fijó con metanol absoluto por tres minutos; después se tiñeron las laminillas con Giemsa; se montaron con bálsamo de Canadá y se realizó el análisis microscópico. En cada ratón se observó la frecuencia de micronúcleos (partículas de DNA presentes en el citoplasma del eritroblasto; tienen forma redonda o almendrada, con un diámetro aproximado de 1/20 a

1/5; se forman únicamente en células en división), en un total de 2000 eritrocitos normocrómicos y 2000 eritrocitos policromáticos.

Pruebas estadísticas

La potencia mutagénica se calculó por medio de las curvas dosis/respuesta usando el programa SALANAL (Salmonella Assay), diseñado especialmente para la prueba de Ames. Las propiedades genotóxicas se determinaron con las pruebas estadísticas análisis de varianza (ANOVA) y Bonferroni.

RESULTADOS

En la prueba de Ames el formocresol y el formaldehído en la cepa TA98 (+S9) y TA100 con y sin activación metabólica, en concentraciones de 25 a 100 mcl/placa se observa un incremento significativo con una $p < 0.05$ y $p < 0.01$, de la frecuencia de colonias revertantes (parámetro indicador de mutagenicidad). En la figura 1 se muestra el crecimiento bacteriano; el cresol dio resultado negativo en este ensayo; el glutaraldehído únicamente en la cepa TA100 (+S9) dio significancia con una $p < 0.05$, a las concentraciones de 12.5 y 25 mcl/placa. Los resultados se muestran en el Cuadro 2.

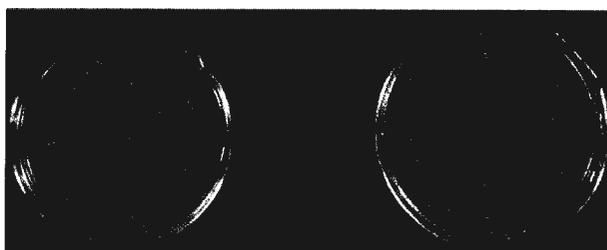


Figura 1. Prueba de mutagenicidad. Se muestra el crecimiento bacteriano no mutagénico y mutagénico de *Salmonella typhimurium*.

En la prueba de micronúcleos el formocresol y el cresol no produjeron efecto clastogénico en el material genético del ratón; la frecuencia de micronúcleos (parámetro indicador de genotoxicidad) no fue significativa con respecto al control positivo. En el formaldehído a las dosis de 43.2 y 50.4 mg/Kg de peso del ratón sí se observa incremento significativo con una $p < 0.05$ en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos del ratón. El glutaraldehído a las dosis de 25 y 30 mg/Kg de peso del ratón también

Cuadro 2. Resultados del ensayo *Salmonella*/microsomas

Compuesto	$\mu\text{cl/placa}$	Colonias revertantes /placa \pm D.S (a)			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
formocresol	0	30.6 \pm 5.0	31.6 \pm 4.1	128.0 \pm 13.5	165.0 \pm 12.0
	25	31.0 \pm 4.5	36.6 \pm 8.3	161.0 \pm 57.3	197.0 \pm 7.9 *
	50	28.6 \pm 4.5	35.0 \pm 5.5	239.0 \pm 33.7 *	278.6 \pm 72.6 *
	75	23.0 \pm 4.6	52.0 \pm 2.0	227.0 \pm 22.1 **	318.0 \pm 6.2 **
	100	21.0 \pm 3.5	52.6 \pm 9.2 **	316.3 \pm 79.0 **	321.0 \pm 30.6 **
	150	37.3 \pm 7.0	66.6 \pm 18.5 *	409.6 \pm 38.6 **	340.6 \pm 83.7 *
cresol	0	43.3 \pm 11.0	29.3 \pm 5.0	132.3 \pm 20.2	158.0 \pm 6.9
	25	29.0 \pm 4.5	38.0 \pm 7.8	145.0 \pm 10.5	190.0 \pm 18.3
	50	33.3 \pm 16.9	25.6 \pm 1.5	154.0 \pm 15.6	192.6 \pm 19.1
	75	26.6 \pm 6.6	27.6 \pm 3.5	150.0 \pm 8.6	187.6 \pm 14.2
	100	22.6 \pm 6.6	32.6 \pm 7.2	126.0 \pm 11.7	184.3 \pm 6.8
formaldehído	0	25.0 \pm 11.2	28.6 \pm 0.5	115.0 \pm 7.2	138.3 \pm 27.0
	25	17.3 \pm 4.7	38.0 \pm 3.6*	149.0 \pm 10.3	183.3 \pm 35.0
	50	41.3 \pm 8.7	71.6 \pm 9.8**	183.3 \pm 5.5**	228.0 \pm 13.7
	75	42.6 \pm 6.5	57.3 \pm 1.1**	224 \pm 25.0**	287.0 \pm 32.2*
	100	45.6 \pm 16.2	37.6 \pm 4.9	97.3 \pm 4.7**	279.0 \pm 24.5**
	150	1.0 \pm 0.0	15.6 \pm 0.5	78.6 \pm 14.4	129.3 \pm 21.5
glutaraldehído	0	21.0 \pm 5.8	28.3 \pm 6.4	199.0 \pm 28.8	231.6 \pm 20.0
	12.5	22.7 \pm 2.0	28.0 \pm 4.0	215.6 \pm 58.7	299.0 \pm 19.1*
	25	23.1 \pm 1.1	33.0 \pm 4.1	197.0 \pm 31.1	307.0 \pm 25.8*
	50	27.0 \pm 3.5	42.1 \pm 7.3	104.6 \pm 6.3	226.6 \pm 82.7
	75	25.0 \pm 3.6	37.4 \pm 2.5	81.9 \pm 5.6	41.6 \pm 14.0

(a) cada valor representa el promedio de las diferentes dosis evaluadas por triplicado y en dos experimentos como mínimo.

* P < 0.05 (ANOVA)

** P < 0.01 (ANOVA)

dio respuesta genotóxica. En la Fig. 2 se muestran eritrocitos micronucleados y los resultados en el cuadro 3.

En el cuadro 4 se resumen los resultados de este trabajo experimental.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que el formocresol el formaldehído y el glutaraldehído inducen mutaciones a través de dos mecanismos: Corrimiento del marco de lectura por delección (cepa TA98), o por sustitución de pares de bases (cepa TA100). El resultado obtenido con el formaldehído coincide con los publicados por Fero ⁴, O'Donovan ⁵, Pfuhrer ⁷. Los resultados del glutaraldehído son inconsistentes, y diferimos con otros autores, Slesinski ¹⁴, y Vergnes ¹⁸.

En la prueba de frecuencia de micronúcleos el formocresol dio resultado negativo igual que el estudio "in vivo" en cultivo de linfocitos de sangre periférica de humano ²¹ y el ensayo cometa realizado por Araki ²². La respuesta negativa del cresol es la misma que obtuvieron Hamaguchi y cols. ⁹.

Se observa claramente que la respuesta positiva del formocresol en la prueba de *Salmonella* sólo se debe a su agente activo, el formaldehído. Al comparar los resultados entre el formocresol y la alternativa propuesta, el glutaraldehído es significativamente menos mutagénico que el formocresol.

Un aspecto relevante en este estudio fue que en la prueba de micronúcleos, la interacción entre el formaldehído y el cresol disminuye hasta en un 70 % la genotoxicidad del formocresol. La respuesta nega-

Cuadro 3. Resultados del ensayo en micronúcleos

Compuesto	mg/Kg	No. Ratonos	Mn/EN $x \pm d.s$	Mn/EP $x \pm d.s$
glic/H ₂ O		6	10.3 ± 5.8	4.5 ± 2.8
ciclofosfamida	60	6	16.5 ± 4.8	72.2 ± 8.7 **
formocresol		24	6.6 ± 3.2	3.3 ± 1.9
	c(43.7) f(23.7)	6	7.5 ± 3.6	5.0 ± 1.2
	c(21.8) f(11.8)	6	5.1 ± 1.4	3.5 ± 2.4
	c(21.8) f(11.8)	6	8.5 ± 3.2	2.6 ± 1.0
	c(21.8) f(11.8)	6	5.3 ± 3.4	2.8 ± 1.1
cresol		24	17.8 ± 6.9	9.5 ± 3.5**
	28	6	18.6 ± 8.2	10.0 ± 5.6
	20.8	6	15.0 ± 4.2	7.1 ± 3.6
	14.4	6	12.8 ± 4.8	5.5 ± 1.7
	5.2	6	8.6 ± 3.7	3.2 ± 2.4
formaldehído		30	21.0 ± 6.9	9.13 ± 3.6**
	50.4	6	25.1 ± 5.8	12.3 ± 3.2 **
	43.2	6	14.8 ± 6.2	10.6 ± 3.8 **
	36.4	6	21.0 ± 7.4	8.8 ± 1.7
	29.2	6	22.3 ± 8.2	8.8 ± 3.7
	21.9	6	21.6 ± 8.0	5.5 ± 1.8
glutaraldehído		36	11.9 ± 7.0	5.7 ± 0.9
	30	6	17.1 ± 2.9	16.1 ± 2.9 **
	25	6	21.6 ± 1.7	16.0 ± 1.4 ± **
	20	6	15.1 ± 2.9	11.3 ± 3.8
	15	6	9.3 ± 1.3	6.0 ± 1.7
	10	6	5.1 ± 2.5	4.5 ± 2.0

c.- cresol

f.- formocresol

Mn/EN.- micro núcleos en eritrocitos normo crómicos.

Mn/EP.- micro núcleos en eritrocitos poli cromáticos.

** P < 0.05 (ANOVA)

Cuadro 4. Resultados experimentales obtenidos

Compuesto	Pruebas					
	TA 98		AMES	TA 100		Micronúcleos
	s/a	c/a	s/a	c/a		
formocresol	-	+	+	+	-	
cresol	-	-	-	-	-	
formaldehído	-	+	+	+	+	
glutaraldehído	-	-	-	+	+	

s/a.- sin actividad metabólica; c/a.- con actividad metabólica.

tiva observada en el ratón, indica que las genotoxinas que produjeron las mutaciones en la prueba de Ames, carecen de propiedades clastogénicas, o que son inhibidas por el sistema enzimático del ratón, el cual puede estar destoxificando las sustancias que dañan

su material genético. Aunque se utilizaron las dosis máximas toleradas por el ratón, probablemente no fueron suficientes para producir un efecto biológico indeseable; el aumentar las dosis hubiera comprometido la vida del modelo experimental.

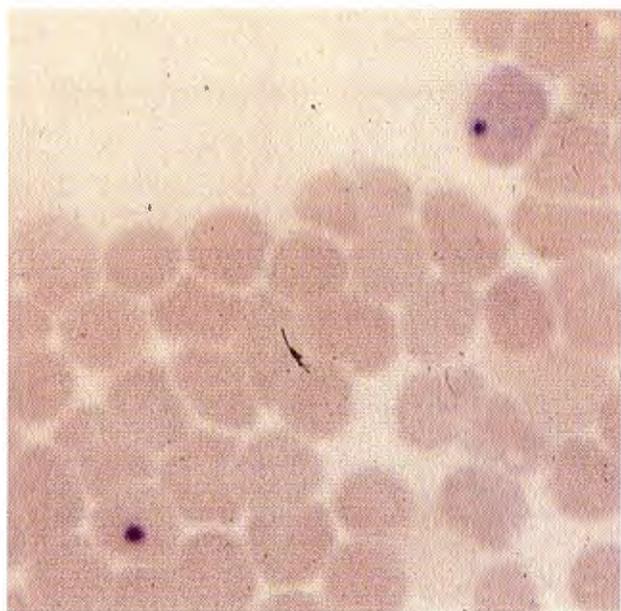


Figura 2. Prueba de genotoxicidad. Se muestra eritrocitos normocromico y policromático micronucleados.

Se utilizaron la prueba de Ames (*Salmonella*/Microsomas) y la inducción de micronúcleos en sangre periférica de ratón para valorar las propiedades mutagénicas y genotóxicas de formocresol, cresol, formaldehído y glutaraldehído; sin embargo, aunque no existe una estandarización sobre qué pruebas son las adecuadas para evaluar las propiedades mutagénicas y genotóxicas de las sustancias químicas a las que está expuesto el paciente odontopediátrico, es necesario y relevante valorar el daño al material genético para tomar la mejor decisión sobre el manejo racional y adecuado de las mismas.

Agradecimientos

Agradecemos a Degussa México la donación del formocresol y cresol para la realización de este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Natarajan AT, Darroudi F, Bussman CJ, van Kesteren-van Leeuwen AC. Evaluation of the mutagenicity of formaldehyde in mammalian cytogenetic assay in vivo and vitro. *Mutat Res* 1983;122:355-60.
- Takahashi K, Morita T, Kawazoe Y. Mutagenic characteristics of formaldehyde on bacterial systems. *Mutat Res* 1985;156:153-61.
- Te-Hsiu M, Harris MM. Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutat Res* 1988;196:37-59.
- Feron VJ, Til HP, Vrijer F, Woutersen RA, Casse FR, van Bladeren PJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res* 1991;259:363-85.
- O'Donovan MR, Mee CD. Formaldehyde is a bacterial mutagen in a range of *Salmonella* and *Escherichia* indicator strains. *Mutagenesis* 1993;8(6):577-81.
- Lewis B. Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. *J Clin Pediatr Dent* 1998;22(2):167-77.
- Pfuhler S, Wolf HU. Effects of the formaldehyde releasing preservatives dimethylol urea and diazolidinyl urea in several short-term genotoxicity tests. *Mutat Res* 2002; 514 (1-2): 133-46.
- Cheng M, Kligerman A,D. Evaluation of the genotoxicity of cresols using sister-chromatid exchange (SCE). *Mutat Res* 1984;137:51-5.
- Hamaguchi F, Tsutsui T. Assessment of genotoxicity of dental antiseptics: ability of phenol, guaiacol, p-phenolsulfonic acid, sodium hypochlorite, p-chlorophenol, m- cresol or formaldehyde to induce unscheduled DNA synthesis in cultured Syrian hamster embryo cells. *Jpn J Pharmacol* 2000;83:273-6.
- Galloway SM, Deasy DA, Bean CL, Kraynak AR. Effects of high strength on chromosome aberrations, sister- chromatid exchanges and DNA strand breaks, and the relation to toxicity. *Mutat Res* 1987;189(1):15-25.
- Doolittle DJ, Lee DA, Lee CK. The genotoxic activity of glycerol in an in vitro test battery. *Food Chem Toxicol* 1988;26(7):631-5.
- Rusmah M. Pulpal tissue reaction to buffered glutaraldehyde. *The J of Clin Pediatr Dent.*1992;16 (2):101-6.
- Davis MJ, Myers R, Switkes MD. Glutaraldehyde : an alternative to formocresol for vital pulp therapy. *ASDC J Dent Child* 1982;176-80.
- Slesinski RS, Hengler WC, Guzzie PJ, Wagner KJ. Mutagenicity evaluation of glutaraldehyde in a battery of in vitro bacterial and mammalian test systems. *Food Chem Toxicol* 1983;21(5):621-9
- Sakagami Y, Yamazaki H, Ogasawara N, Yokoyama H, Ose Y, Sato T. The evaluation of genotoxic activities of disinfectants and their metabolites by umu test. *Mutat Res* 1988;209 (3-4):155-60.
- St Clair MB, Bermúdez E, Gross EA, Butterworth BE, Recio L. Evaluation of the genotoxic potential of glutaraldehyde. *Environ and Mol Mutagen* 1991;18:113-9.
- NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Glutaraldehyde (CAS No.111-30-8) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1999;490:1-234.
- Vergnes JS, Ballantyne B. Genetic toxicology studies with glutaraldehyde. *J Appl Toxicol.* 2002;22(1):45-60.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173-215.
- Schlegel R, MacGregor JT. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutat Res* 1982;104:367-9.
- Zarzar PA, Rosenblatt A, Takahashi CS, Takeuchi PL, Costa Júnior LA. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study. *J of Dentistry* 2003;31:479-85.
- Araki RD, Alencar MM, Fávero SD. Lack of formocresol, paramonochlorophenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. *J of Endodontics* 2004;30(8):593-6.