

# Toxicidad *in vitro* del formocresol y sulfato férrico sobre macrófagos murinos

M. L. CARDOSO, M. V. AGUIRRE<sup>1</sup>, G. V. QUINTERO DE LUCAS<sup>2</sup>, C. NORA BRANDAN<sup>3</sup>

Secretaría General de Ciencia y Técnica. <sup>1</sup>Facultad de Medicina. <sup>2</sup>Facultad de Odontología. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. Argentina

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de respuesta, *in vitro*, de macrófagos peritoneales murinos (Møp) a diferentes concentraciones de formocresol (FC) (1:10, 1:100, 1:1000) y sulfato férrico (SF) (1:100, 1:1000, 1:10000). Se obtuvieron suspensiones de Møp ( $1 \times 10^6$  cel/ml) a partir de lavados peritoneales con cloruro sódico al 0,9% y a 37 °C. Los macrófagos fueron incubados con la fórmula de Buckley (FC), SF y sus respectivos controles durante 30 y 60 minutos a 37 °C en un ambiente con 5% CO<sub>2</sub>. Las células expuestas al FC (1:10) manifestaron diferencias significativas en los valores de viabilidad y necrosis celular comparadas con las del control. El SF indujo los máximos valores de apoptosis en las diluciones de 1:100 y 1:1000. Los datos obtenidos sugieren que ambas drogas causan daño celular, siendo diferente el tipo de muerte celular que inducen. Sin embargo, el SF ha demostrado ser menos citotóxico para la población de células macrofágicas.

PALABRAS CLAVE: Apoptosis. Necrosis. Pulpotomías.

## ABSTRACT

The aim of this study was to measure the *in vitro* bioactivity of murine peritoneal macrophages (Møp) at different concentrations of formocresol (FC) (1:10, 1:100, 1:1000) and ferric sulphate (FS) (1:100, 1:1000, 1:10000). The macrophages suspensions ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were obtained by peritoneal washings with sodium chloride 0.9% at 37 °C. The Møp cultures were incubated with Buckley's formulation (FC) and FS, against controls, for 30 and 60 minutes at 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Cellular viabilities and necrotic indexes were affected with 1:10 FC treatment for 30 minutes. FS induced the maximum apoptotic indexes with 1:1000 dilutions. This study suggests that both, FC and FS caused cellular injury. Moreover, FS has less toxicity for macrophagic populations.

KEY WORDS: Apoptosis. Necrosis. Pulp therapy.

## INTRODUCCIÓN

En la práctica odontológica se utilizan numerosos materiales para el tratamiento de las piezas dentarias afectadas, que ejercen efecto tanto localmente como por su difusión hacia los tejidos circundantes.

Hasta ahora, en odontopediatría, el formocresol (FC) continúa siendo uno de los medicamentos más ampliamente utilizados, para el tratamiento del tejido pulpar inflamado en dientes primarios (1,2).

La fórmula original del FC descrita por Buckley en 1904, y actualmente en uso, está compuesta por formal-

dehído 19%, cresol 35%, en una solución de glicerina y agua al 15%, asociándose el formaldehído con la producción de efectos colaterales adversos tales como citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad celular (3). Estudios realizados, mayoritariamente en décadas pasadas, en animales de experimentación sometidos a terapias pulpares demostraron que el formaldehído marcado con carbono radioactivo (<sup>14</sup>C) se distribuía sistémicamente en pequeñas cantidades en el músculo, hígado, corazón, bazo y riñones (menos del 1% del total administrado) (4-7).

Estudios experimentales sugirieron, que la exposición celular a altas concentraciones de formaldehído lleva a la formación de compuestos, como el *DNA protein cross-links* (DPX), que no es un vector de desarrollo tumoral, sino un factor citotóxico que conduce a la

muerte celular y que, en último término, puede inducir carcinogenicidad en el tejido expuesto (8), no habiendo hasta el presente suficiente evidencia científica que sustente que produce el mismo efecto en sitios distantes (9). A fin de permitir una más pronta recuperación celular y disminuir el riesgo de difusión sistémica, Morawa y cols. (10) recomendaron la utilización del FC diluido 1:5 con glicerina y agua (1 parte de FC, 3 de glicerina y 1 de agua), aunque recientemente Zarzar y cols. (11), en muestras sanguíneas de niños sometidos a terapias pulpares, no encontraron diferencias estadísticamente significativas con la utilización del FC puro comparativamente con el diluido.

Buscando nuevas alternativas para la fijación de tejido pulpar, surgió la utilización del sulfato férrico (SF). Este medicamento produce inflamación local reversible en los tejidos blandos orales no describiéndose hasta el presente efectos sistémicos (12,13). Los estudios clínicos de la última década indican que el SF, en solución al 15,5% es un excelente medicamento para pulpotomías vitales en dentición temporal, por sus propiedades hemostáticas y la compatibilidad biológica con el tejido pulpar y los tejidos subyacentes. El efecto hemostático del SF en el sitio de amputación pulpar, se produce por la reacción entre la sangre, los iones (hierro y sulfato), y el pH ácido de la solución, que permiten una aglutinación de proteínas formando tapones que ocluyen los capilares (14).

El desarrollo de técnicas mediante la utilización de cultivo de células nos ha permitido estudiar la biocompatibilidad de los materiales reproduciendo las condiciones y reacciones similares a las que ocurren en el propio organismo, permitiéndonos así, observar y cuantificar las alteraciones sufridas por cada una de las células en forma particular, cuando éstas entran en contacto con drogas o medicamentos (15). La facilidad con la que pueden obtenerse estas células ha hecho que los macrófagos peritoneales murinos sean utilizados en numerosas ocasiones como modelo celular *in vitro*, para estudios de biocompatibilidad de materiales odontológicos (16).

El objetivo de este estudio fue determinar la toxicidad, *in vitro*, del FC y el SF sobre macrófagos peritoneales murinos (Møp), a través de la viabilidad y la morfología celular (apoptosis y necrosis).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES

Se utilizaron 32 ratones isogénicos de la cepa Swiss CF1 (26 a 28 g), provenientes del estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste Argentina, que fueron mantenidos con dieta estándar y agua *ad libitum* y manejados de acuerdo a los principios de la *Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio* (NIH, Bethesda, MD, 1996).

A fin de producir una reacción inflamatoria en el peritoneo, el día 0, se inyectó 1 ml de tioglicolato intraperitoneal a cada ratón. Después de tres días, se inyectaron 5 ml de solución fisiológica fría, al 0,9% y estéril, efectuándose un suave masaje abdominal para obtener

las células peritoneales. Esta suspensión fue centrifugada a 10 G, durante diez minutos obteniéndose el *pellet* definitivo que se resuspendió en 2 ml de  $\alpha$ -medio (MEM, Alpha Modification Sigma Co.), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS/Genser, Argentina), 2 mm de glutamina, 30 mm de hepes, 0,4% de bicarbonato de sodio, y penicilina-estreptomina (100  $\mu$ l/ml y 100  $\mu$ g/ml). Mediante tinción de May-Grünwald-Giemsa (MGG) se identificó la morfología de los macrófagos, obteniéndose entre un 80-90% de células macrofágicas, 4-15% linfocitos, y un 1-6% de células mieloides. Verificada la presencia de Møp se utilizó el método de exclusión de Azul de Trypan para determinar la viabilidad celular inicial.

Los macrófagos obtenidos fueron tratados con fórmula de Buckley (FC) (cresol 35% - formaldehído 19% en un vehículo de glicerina y agua) diluido a concentraciones finales de 1:10, 1:100 y 1:1000, y SF 16%. (Viscostat-Ultradent, UTA 84095 EE. UU.), a diferentes concentraciones, 1:100, 1:1.000, 1:10.000.

### DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Las suspensiones celulares obtenidas del peritoneo se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos, en un volumen final de 500  $\mu$ l que fueron incubadas en estufa de gas (37 °C y 5% CO<sub>2</sub>). Para favorecer la adhesión macrofágica, después de una hora, se adicionaron las diluciones de FC y SF incubándolas a 37 °C y, en dos grupos de placas, uno tratado por 30 minutos y otro por 60 minutos, con sus respectivos controles. La viabilidad celular para las drogas utilizadas, se determinó con la técnica de exclusión del Azul de Trypan, permitiéndonos detectar las células muertas por la coloración azul que adoptan al tener disrupciones en su membrana. El número total de células y el porcentaje de células no viables fue determinado, a cada tiempo, usando un hemocitómetro bajo microscopía óptica. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje del número de células vivas/número de células totales.

### ANÁLISIS MORFOLÓGICO DESCRIPTIVO

Se distribuyó la suspensión de macrófagos peritoneales conteniendo  $1 \times 10^6$  células, en cubreobjetos de 11 mm, incubándolas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, en dos grupos uno durante 30 minutos y otro a los 60 minutos con las concentraciones de FC y SF previamente establecidas. Posteriormente, las placas fueron lavadas con CIN a 0,9% para su tinción con MGG.

Se realizó la identificación de las células macrofágicas cuantificándolas y observando su tipo y distribución mediante microscopía óptica, obteniéndose el porcentaje de células características en 500 células totales contadas en diferentes campos tomados al azar (400x).

Los parámetros estructurales fueron descritos, por un solo observador, basándonos en los siguientes criterios (17,18):

— Forma celular: esférica, estrellada, irregular o alterada.

—Citoplasma: homogéneo, denso y/o con presencia de vacuolas.

—Membrana citoplasmática: íntegra o rota.

—Forma nuclear: arriñonada, centralizada, periferal, picnótica o fragmentada.

—Cromatina nuclear: fina, levemente distribuida o densa.

—Membrana nuclear: íntegra o rota.

—Presencia de granulaciones extracelulares.

Las células fueron caracterizadas de acuerdo a los siguientes parámetros:

—*Célula normal* a aquella que presente núcleo íntegro central o polarizado con forma esférica o arriñonada, membrana citoplasmática intacta, forma celular esférica o con prolongaciones.

—*Célula apoptótica* a aquella que muestre condensaciones nucleares, vacuolizaciones, núcleos fragmentados, membranas rotas pero sin pérdida de la integridad celular y formación de cuerpos apoptóticos en el citoplasma.

—*Célula necrótica* aquella que presente pérdida de la continuidad citoplasmática, estallido y desorganización celular y nuclear.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados utilizando ANOVA test de Tuckey, estableciéndose como criterio de significación estadística  $p < 0,05$ . Para la correlación entre diferentes parámetros se utilizó el test de Spearman.

## RESULTADOS

### CITOTOXICIDAD

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  del error estándar de la media (SEM) de los ensayos realizados por cuadruplicado, para cada concentración de SF y FC, con sus respectivos controles.

Para el FC se observó que a mayor concentración menor viabilidad celular. Diluciones de 1:10, a los 30 y 60 minutos ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  respectivamente) y de 1:100 a los 60 minutos ( $p < 0,05$ ) demostraron diferencias estadísticamente significativas. Diluciones de 1:1000 a los 30 y 60 minutos no demostraron diferencias estadísticamente significativas comparativamente con el grupo control (Fig. 1).

Los grupos tratados durante 30 minutos con diluciones del SF de 1:100, 1:1000 y 1:10000, demostraron porcentajes similares al grupo control de células viables. A los 60 minutos, diluciones de 1:100 y 1:1000 demostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) (Fig. 2).

### TIPIFICACIÓN CELULAR POR MAY GRÜNWARD GIEMSA (MGG)

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de los ensayos realizados por cuadruplicado, para cada concentración de SF y FC, con sus respectivos controles.

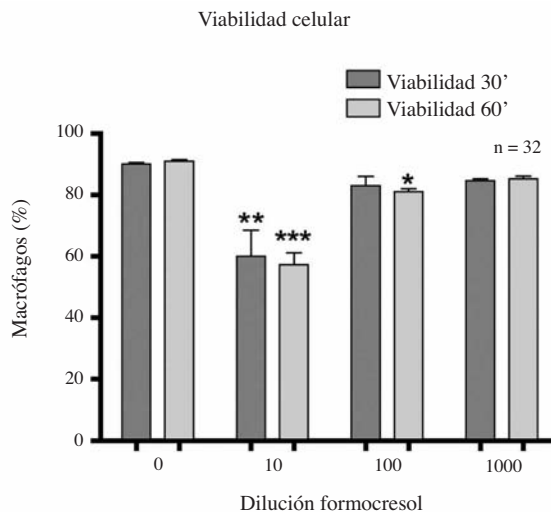


Fig. 1. Porcentaje de  $M\phi$  viables en diferentes diluciones del FC, a los 30 y 60 minutos de incubación. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .

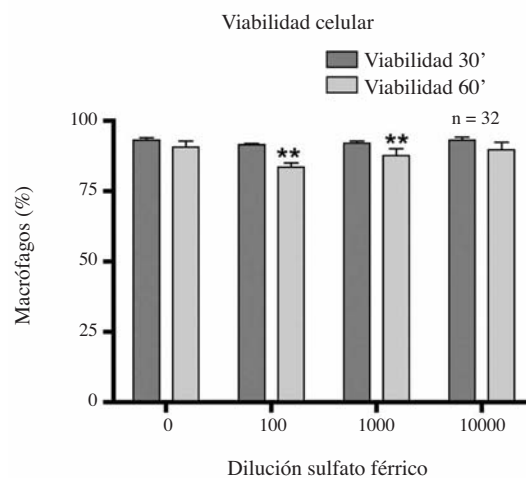


Fig. 2. Porcentaje de  $M\phi$  viables en diferentes diluciones del SF, a 30 y 60 minutos de incubación. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .

El SF produjo porcentajes de necrosis similares a los observados en el grupo control, no siendo estos valores estadísticamente significativos. El FC demostró una relación directa entre su concentración y el porcentaje de células necróticas observadas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en todas las diluciones comparativamente con el control (Fig. 3).

El índice apoptótico demostró que el SF a mayor concentración, produjo mayores porcentajes de apoptosis siendo estas diferencias estadísticamente significativas en las diluciones de 1:100 y 1:1000 ( $p < 0,001$ ). El FC demostró diferencias estadísticamente significativas en la dilución 1:100 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 4).

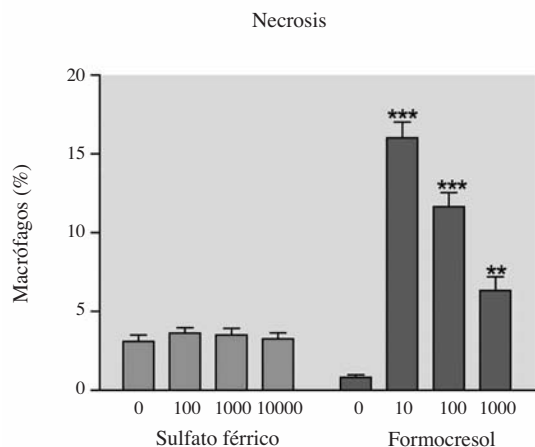


Fig. 3. Porcentaje de células  $M\phi$  necróticas expuestas durante 60 minutos a diferentes diluciones de SF y FC con sus respectivos controles. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .

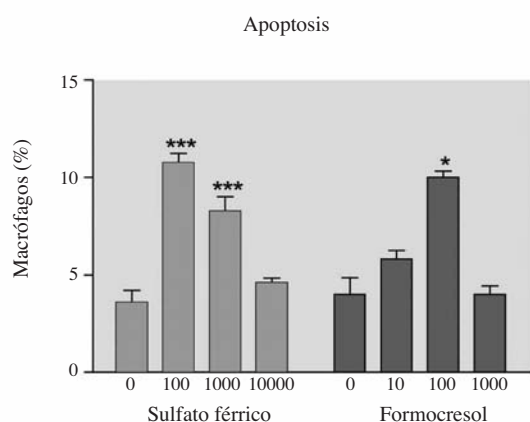


Fig. 4. Porcentaje de células  $M\phi$  apoptóticas expuestas durante 60 minutos a diferentes diluciones de SF y FC con sus respectivos controles. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .

La tabla I corresponde al porcentaje de células obtenidas en la viabilidad y necrosis celular en cada una de las diluciones de FC a los 60 minutos de incubación y demostró que, a una mayor concentración, le corresponde una menor viabilidad y una mayor necrosis celular (Tabla I). La correlación entre el porcentaje de células viables y la necrosis demostró una relación negativa  $r = -0,967$ .

La tabla II corresponde al porcentaje de células obtenidas en la viabilidad y apoptosis celular en cada una de las diluciones de SF a los 60 minutos de incubación y demostró que, a una mayor concentración, le corresponde una menor viabilidad y una mayor apoptosis celular (Tabla II). La correlación entre el porcentaje de células viables y la necrosis demostró una  $r = -0,967$ .

TABLA I

PORCENTAJES DE CÉLULAS VIABLES Y NECRÓTICAS OBSERVADAS A LOS 60 MINUTOS A DIFERENTES DILUCIONES DE FC

Dilución formocresol	Viabilidad (%)	Necrosis (%)
0	90	0,83
1:10	52	16,00
1:100	77	11,66
1:1000	84,66	6,33

TABLA II

PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES Y APOPTÓTICAS OBSERVADAS EN LAS DIFERENTES DILUCIONES DE SF A LOS 60 MINUTOS

Dilución sulfato férrico	Viabilidad (%)	Apoptosis (%)
0	88,40	3,625
1:100	69,25	10,750
1:1000	82,50	8,250
1:10000	93	4,62

## DISCUSIÓN

El uso de células de cultivo en los trabajos de investigación odontológica, para evaluar la biocompatibilidad de los materiales utilizados, ha progresado durante estos últimos años, permitiéndonos observar y cuantificar las alteraciones sufridas por cada una de las células de forma particular, cuando estas entran en contacto con drogas o medicamentos, restringiendo el número de variables (15).

La utilización de medicamentos sobre tejidos vitales, provoca una respuesta de tipo inflamatorio, que induce, tanto a los monocitos recién llegados al tejido como a los macrófagos residentes, a proliferar y expandirse. El macrófago así activado, sufre una estimulación metabólica, generando no solo cambios morfológicos –agrandándose– sino también, funcionales –adquiriendo mayor capacidad para la adhesión, quimiotaxis y fagocitosis–, especialmente para fagocitar partículas opsonizadas (19).

La viabilidad celular es un importante parámetro para evaluar la calidad de las condiciones experimentales *in vitro*, siendo además, el principal bioindicador de éxito de los cultivos celulares, garantizando datos fiables en los estudios de citotoxicidad (20). Para una evaluación inicial de los aspectos toxicológicos en respuesta a diferentes biomateriales, los sistemas de cultivos celulares proporcionan un medio conveniente, controlable y repetible.

En el presente estudio el porcentaje de macrófagos viables en los grupos controles, después de 24 horas de incubación, se mantuvo entre un 80-90%. En los grupos experimentales la viabilidad celular se vio afectada en

los grupos con mayor concentración de FC (1:10, 1:100) y SF (1:100, 1:1000). Los valores en la viabilidad celular para el FC en la concentración 1:10, sugieren un daño celular agudo revelado, también, por el índice de necrosis celular, sin embargo esta concentración (1:10) no fue empleada para el sulfato férrico ya que el cambio que producía en el pH del medio de cultivo no permitió el desarrollo celular. Las concentraciones utilizadas de SF, no produjeron descensos significativos en el porcentaje de células viables, sin embargo el índice de apoptosis se incrementó en las mayores concentraciones. Estos resultados podrían explicarse ya que en un estadio temprano de apoptosis no se produce la ruptura de la membrana celular, lo que no permite la entrada del colorante (Azul de Trypan) al citoplasma.

Straffon y cols. (21,22) analizaron los efectos del FC sobre células de tejido conjuntivo de hámster y observaron una definida reducción en el número de células inflamatorias permitiendo una rápida recuperación del tejido, al disminuir la concentración del FC.

Schweikl (23) analizó el efecto de una solución de FC al 20% sobre molares temporales de monos, sugiriendo que éste podría ser un medicamento alternativo para procedimientos de pulpotomías vitales, debido a que, si bien se producen cambios pulpares, no se evidenció destrucción de tejido o lesiones periapicales. El porcentaje de células viables fue similar en los grupos que tenían la misma concentración de FC y SF (1:100, 1:1000), sin embargo el tipo de muerte celular que induce cada droga es diferente, lo que se observó mediante evaluación morfológica. Mientras que los mayores valores de necrosis celular se observaron en los grupos cultivados con FC, los valores de apoptosis se incrementaron en los incubados con SF.

La apoptosis y necrosis son dos tipos de muerte celular que exhiben características distintivas desde el punto de vista bioquímico y morfológico. Sin embargo, estas dos modalidades de muerte celular fueron consideradas como opuestas, y actualmente se las describe como procesos dinámicos que interactúan, desencadenando la muerte celular. Diferenciar qué tipo de muerte celular induce una determinada droga nos indica qué tipo de daño celular produce. Estudios en los que se extienda el periodo de incubación y se empleen métodos de mayor sensibilidad y especificidad serán realizados para ampliar los conocimientos obtenidos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Srta. Mirta Alba Álvarez y al Ldo. Juan Santiago Todaro por su constante asesoramiento técnico.

### CORRESPONDENCIA:

M. L. Cardoso  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional del Nordeste  
B° Yapeyú Gdor. Martínez 2880  
C.P. 3400 Corrientes, Argentina  
e-mail: camalo78@yahoo.com.ar

## BIBLIOGRAFÍA

- Hunter ML, Hunter B. Vital pulpotomy in the primary dentition: attitudes and practices of specialist in paediatric dentistry practicing in the United Kingdom. *Int J Ped Dent* 2003; 13(4): 246-50.
- Primosh R, Glomb T, Jerrell R. Primary tooth therapy as taught in pediatric dental programs in the United States. *Pediatr Dent* 1997; 19(2): 118-22.
- Casa MJ, Kenny DJ, Judo PL, Johnston DH. Do we still need formocresol in pediatric dentistry? *J Can Dent Assoc* 2005; 71(10): 749-51.
- Ranly DM. Assessment of the systemic distribution and toxicity of formaldehyde following pulpotomy treatment: part one. *ASDC J Dent* 1985; 52(6): 4331-4.
- Myers DR, Parshley DH, Whitford GM, McKinney RV. Tissue changes induced by the absorption of formocresol from pulpotomy sites in dogs. *Pediatr Dent* 1983; 5(1): 6-8.
- Myers D, Shoat K, Dirksen T, Pashley DH, Whitford GM, Reynolds KE. Distribution of <sup>14</sup>C-formaldehyde after pulpotomy with formocresol. *J Am Dent Assoc* 1978; 96(5): 805-13.
- Pashley E, Myers D, Pashley DH, Whitford G. Systemic distribution of <sup>14</sup>C-formaldehyde from formocresol treated pulpotomy sites. *J Dent Res* 1980; 59(3): 602-8.
- Merk O, Speit G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein cross links form mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33(3): 267-72.
- Kligerman AD, Phelps MC, Erexon GL. Cytogenetic analysis of lymphocytes from rats following formaldehyde inhalation. *Toxicol Lett* 1984; 21(3): 241-6.
- Morawa AP, Straffon LH, Han SS, Corpron RE. Clinical evaluation of pulpotomies using dilute formocresol. *J Dent Child* 1975; 42: 360-3.
- Zarzar PA, Rosenblatt A, Takahashi CS, Takeuchi PL, Costa Junior LA. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study. *J Dent* 2003; 31(7): 479-85.
- Casas MJ, Kenny DJ, Johnson DH, Judo PL. Long-term outcomes of primary molar ferric sulphate pulpotomy and root canal therapy. *Pediatr Dent* 2004; 26(1): 44-8.
- Shaw DH, Krejci RF, Kalkwart KL, Wentz FM. Gingival response to retraction by ferric sulphate (Astringent). *Oral Dent* 1983; 8(4): 142-7.
- Fuks AB, Gideon H, Davis JM, Eidelman E. Ferric sulphate versus dilute formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow up. *Pediatr Dent* 1997; 19: 327-30.
- Santos EM, Pager MMM, Guedes-Pintos AC. Caracterização de modelo de macrófagos en cultura para testes de toxicidade. *Braz Oral Res* 2000; 14: 87.
- Segura JJ, Jiménez Rubio A, Calvo JR. Effects of formocresol alone vs formocresol with eugenol on macrophage adhesion to plastic surfaces. *Pediatr Dent* 1998; 20: 30-177.
- Descamps-Latscha B. Cellules phagocytaires. In: Jean-François B, editor. *Traité d'Immunologie*. París: Medicine-Sciences flammation; 1993. p.133-56.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 1998. p. 217.
- Segura JJ, Jimenez-Rubio A, Calvo JR. Expressions of VIP receptors in rat peritoneal macrophages is stimulated by inflammatory stimuli. *J Neuroimmunol* 1996; 64: 1-7.
- Núñez RM, Rodríguez AB, Barriga C, de la Fuente M. In vitro and in vivo effects of imipenem on phagocytic activity of murine peritoneal macrophages. *APMIS* 1989; 97: 879-86.
- Straffon LH, Han SS. The effects of formocresol on hamster connective tissue cells, a histologic and quantitative radioautographic study with proline-H<sup>3</sup>. *Arch Oral Biol* 1968; 13: 271-88.
- Straffon LH, Han SS. Effect of varying concentrations of formocresol on RNA synthesis of connective tissue in sponge implants. *Oral Surg* 1970; 29: 915-25.
- Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 292-9.

## *In vitro* toxicity of formocresol and ferric sulphate on murine macrophages

M. L. CARDOSO, M. V. AGUIRRE<sup>1</sup>, G. V. QUINTERO DE LUCAS<sup>2</sup>, C. NORA BRANDAN<sup>3</sup>

*General Secretary of Sciences and Technique. <sup>1</sup>Faculty of Medicine. <sup>2</sup>Faculty of Odontology. National University of Nordeste. Corrientes. Argentina*

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de respuesta, *in vitro*, de macrófagos peritoneales murinos (Møp) a diferentes concentraciones de formocresol (FC) (1:10, 1:100, 1:1000) y sulfato férrico (SF) (1:100, 1:1000, 1:10000). Se obtuvieron suspensiones de Møp ( $1 \times 10^6$  cel/ml) a partir de lavados peritoneales con cloruro sódico al 0,9% y a 37 °C. Los macrófagos fueron incubados con la fórmula de Buckley (FC), SF y sus respectivos controles durante 30 y 60 minutos a 37 °C en un ambiente con 5% CO<sub>2</sub>. Las células expuestas al FC (1:10) manifestaron diferencias significativas en los valores de viabilidad y necrosis celular comparadas con las del control. El SF indujo los máximos valores de apoptosis en las diluciones de 1:100 y 1:1000. Los datos obtenidos sugieren que ambas drogas causan daño celular, siendo diferente el tipo de muerte celular que inducen. Sin embargo, el SF ha demostrado ser menos citotóxico para la población de células macrofágicas.

**PALABRAS CLAVE:** Apoptosis. Necrosis. Pulpotomías.

### ABSTRACT

The aim of this study was to measure the *in vitro* bioactivity of murine peritoneal macrophages (Møp) at different concentrations of formocresol (FC) (1:10, 1:100, 1:1000) and ferric sulphate (FS) (1:100, 1:1000, 1:10000). The macrophages suspensions ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were obtained by peritoneal washings with sodium chloride 0.9% at 37 °C. The Møp cultures were incubated with Buckley's formulation (FC) and FS, against controls, for 30 and 60 minutes at 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Cellular viabilities and necrotic indexes were affected with 1:10 FC treatment for 30 minutes. FS induced the maximum apoptotic indexes with 1:1000 dilutions. This study suggests that both, FC and FS caused cellular injury. Moreover, FS has less toxicity for macrophagic populations.

**KEY WORDS:** Apoptosis. Necrosis. Pulp therapy.

### INTRODUCTION

In the practice of dentistry, various materials are used for treating damaged teeth that, in addition to having a local effect, are diffused to surrounding tissues. In pediatric dentistry, formocresol (FC) continues being one of the most widely used drugs for treating inflamed pulp tissue in primary teeth (1,2). The original formula for FC described by Buckley in 1904, which is still in use, is made up of 19% formaldehyde, 35% cresol in a 15% glycerin and water solution. Formaldehyde is associated with adverse collateral effects such as cytotoxicity, genotoxicity and cell mutagenicity (3). Studies carried out mainly over the last decades on experimental animals subjected to pulp therapies showed that formaldehyde tagged with radioactive coal (14C) was

distributed systemically in small amounts to the muscle, liver, heart, spleen and kidneys (less than 1% of the total administered) (4-7).

Experimental studies suggest that cell exposure to high concentrations of formaldehyde leads to the formation of components, such as *DNA-protein cross-links (DPX)*, which is not a vector for tumor development, but a cytotoxic factor leading to cell death, and which finally could lead to carcinogenicity of the tissue at risk (8). To date there is no sufficient scientific evidence to support that the same effect arises in distant sites (9). With the aim of allowing earlier cell recovery and diminishing the risk of systemic spread, Morawa and cols. (10) recommended using FC diluted 1:5 with glycerin and water (1 part FC, 3 parts glycerin and 1 part water), although recently Zarzar and cols. (11) did not

find statistically significant differences in the blood samples of children who had undergone pulp therapy, when pure and diluted FC were compared.

The use of ferric sulphate (FS) arose as a result of the search for a new fixative alternative for pulp tissue. This drug produces local reversible inflammation in oral soft tissues with no systemic effects having been described to date (12,13). Clinical studies carried out over the last decade indicate that FS in a 15.5% solution is an excellent drug for vital pulpotomies in the primary dentition, given its haemostatic properties and biologic compatibility with pulp tissue and underlying tissue. The haemostatic effect of the FS where the pulp has been amputated arises because of the reaction of the blood, the ions (iron and sulphate) and the acid pH of the solution, which permit protein agglutination that forms plugs, which block the capillaries (14). The development of techniques by means of the cultivation of cells has enabled us to study the biocompatibility of the materials, reproducing the conditions and reactions that are similar to those that occur in the organism itself, enabling us to observe and quantify the disturbances suffered by each particular cell when coming into contact with drugs or medicines (15). The ease with which these cells can be obtained has meant that murine peritoneal macrophages can be used in numerous occasions as *in vitro* cell models for biocompatibility studies of dental materials (16).

The aim of this study was to determine the toxicity *in vitro* of FC and FS on murine peritoneal macrophages (Møp), through cell viability and morphology (apoptosis and necrosis).

## MATERIALS AND METHODS

### ANIMALS

Thirty two isogenic mice of the Swiss CF-1 strain (26 to 28 g), from the laboratory of the Faculty of Medicine of the Universidad Nacional del Nordeste Argentina, were given a standard diet of water *ad libitum* and handled according to the *Guide for the care and use of laboratory animals* (NIH, Bethesda, MD, 1996).

In order to produce an inflammatory reaction in the peritoneum, 1 ml of thioglycolate was injected intraperitoneally into each mouse on Day 0. After three days, 5 ml of 0.9% cold sterile saline was injected into each mouse and a gentle abdominal massage was carried out in order to obtain peritoneal cells. This suspension was centrifuged at 10 G for ten minutes and the final pellet was obtained which was then re-suspended in 2 mL of  $\alpha$ -medium (MEM, Alpha Modification Sigma Co.), with a supplement of 10% de Fetal Bovine Serum (FBS/Genser, Argentina), 2 mM de glutamine, 30 mM Hepes, 0.4% sodium bicarbonate, and penicillin-streptomycin (100  $\mu$ l/ml and 100  $\mu$ g/ml). The morphology of the macrophages was identified by means of May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining, and 80-90% macrophage cells were obtained, 4-15% lymphocytes and 1-6% myeloid cells. Once the presence of Møp had been verified, the Trypan Blue Exclusion method was used to determine initial cell viability.

The macrophages that were obtained were treated with Buckley's FC formula (35% cresol-19% formaldehyde in a glycerin and water vehicle) diluted in final concentrations of 1:10, 1:100 and 1:1000 and with 16% FS (Viscostat-Ultradent, UTA 84095 USA) in different concentrations 1:100 and 1:1.000 and 1:10.000.

### CELL VIABILITY DETERMINATION

The cell suspensions obtained from the peritoneum, were placed in 24 well culture plates, with a final volume of 500  $\mu$ l and incubated in a gas stove (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>). In order to facilitate macrophage adhesion, after an hour the FC and FS concentrations were added at 37 °C and in two groups of plates. One was treated for 30 minutes and the other for 60 minutes, together with their respective controls. Cell viability for the drugs used was determined by means of the Trypan Blue exclusion technique, which enables dead cells to be detected as a result of blue staining due to membrane damage. The total number of cells and the percentage of non-viable cells was determined using a hemocytometer under an optic microscope every time. Cell viability was expressed as the percentage of live cells/total number of cells.

### DESCRIPTION OF MORPHOLOGICAL ANALYSIS

The suspension of peritoneal macrophages containing 1 x 10<sup>6</sup> cells was distributed in 11mm coverslips and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, in two groups, one for 30 minutes and the other for 60 minutes with the FC and FS previously established concentrations. The plates were then washed with 0.9% CaCl and stained with MGG stain.

The macrophage cells were identified and quantified. Their type and distribution was observed by optical microscope, and the percentage was obtained of characteristic cells in 500 cell totals randomly counted in different fields (400x).

The structural parameters were described by just one observer based on the following criteria (17,18):

- Cell shape: spherical, star-shaped, irregular or disturbed.
- Cytoplasm: homogenous, dense and/or with vacuoles.
- Cytoplasmic membrane: intact or broken.
- Nuclear shape: kidney, centralized, peripheral, pyknotic or fragmented.
- Nuclear chromatin: fine, loosely or densely packed.
- Nuclear membrane: intact or broken.
- Presence of extracellular granulation tissue.

The cells were distinguished according to the following parameters:

—*Normal cells* were those cells with a central, intact or polarized nucleus with a sphere or kidney shape, an intact cytoplasmic membrane, with a sphere or branching cell shape.

—*Apoptotic cells* were those showing nuclear condensation, vacuolization, fragmented nuclei, broken

membranes but with no loss of cell integrity and apoptotic body formation in the cytoplasm.

—*Necrotic cells* were those with a loss of cytoplasmic continuity, that showed bursting and disorganization of cells and nuclei.

**STATISTICAL ANALYSIS**

The data were analyzed using the ANOVA Tukey test, and  $p < 0.05$  was established as the criteria for statistical significance. The Spearman test was used for the correlation between the different parameters.

**RESULTS**

**CYTOTOXICITY**

The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) in the trials carried out in quadruplicate, for each FS and FC concentration with their respective controls.

With regard to FC, it was observed that the greater the concentration, the less cell viability. Concentrations of 1:10 and those of 30 and 60 minutes ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively) and of 1:100 at 60 minutes ( $p < 0.05$ ) showed statistically significant differences. Concentrations of 1:1000 at 30 and 60 minutes did not demonstrate statistically significant differences when compared with the control group (Fig. 1).

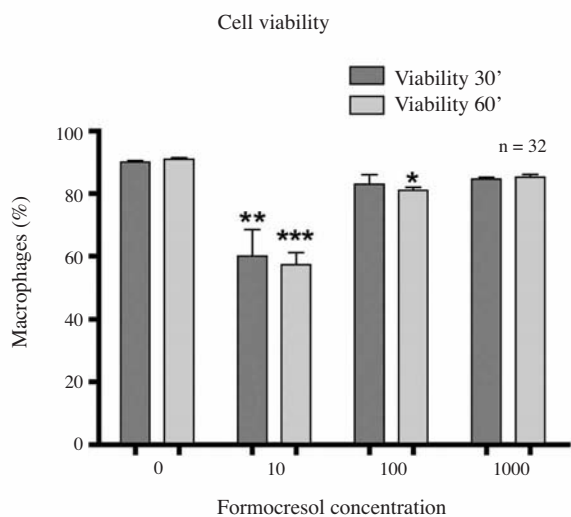


Fig. 1. Percentage of viable  $M\phi$  in different FC concentrations at 30 and 60 minutes of incubation. \*\*\* $p < 0.001$  \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ .

The groups treated for 30 minutes with FS concentrations of 1:100, 1:1000 and 1:10000, showed percentages similar to the control groups regarding viable cells. At 60 minutes, concentrations of 1:100 and 1:1000 showed statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2).

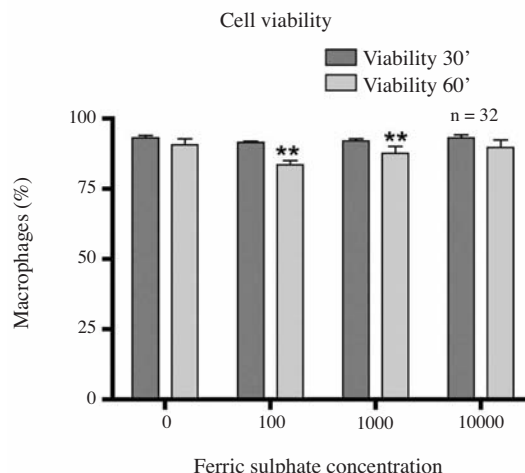


Fig. 2. Percentage of viable  $M\phi$  in different FS concentrations at 30 and 60 minutes of incubation. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ .

**CELL TYPING BY MAY GRÜNWARD GIEMSA (MGG)**

The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the trials carried out in quadruplicate, for each concentration of FS and FC, with their respective controls.

FS produced percentages of necrosis that were similar to those observed in the control group, but these values were not statistically significant. FC showed a direct relationship between concentration and the percentage of necrotic cells observed, and these differences were statistically significant in all the concentrations compared with their respective controls (Fig. 3).

The Apoptotic index showed that FS at a greater concentration produced greater percentages of apoptosis

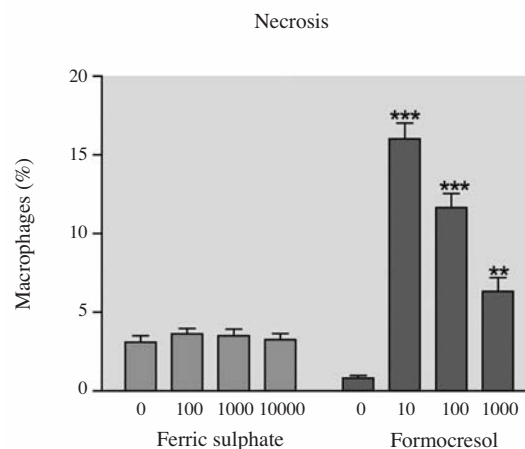


Fig. 3. Percentage of necrotic  $M\phi$  cells exposed for 60 minutes to different FS and FC concentrations with their respective controls. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ .



and these differences were statistically significant in concentrations of 1:100 and 1:1000 ( $p < 0.001$ ). FC showed statistically significant differences with the concentration 1:100 ( $p < 0.05$ ) (Fig.4).

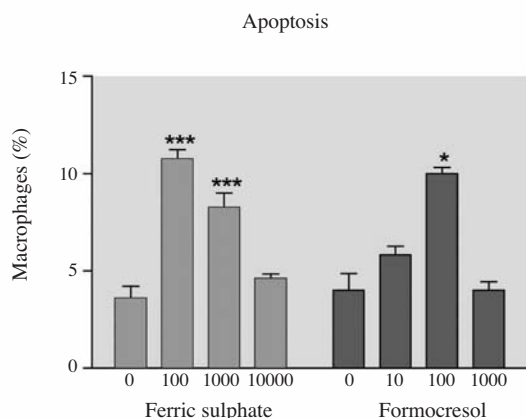


Fig. 4. Percentage of apoptotic *Mφ* cells exposed for 60 minutes to different FS and FC concentrations with their respective controls. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ .

Table I shows the percentage of cells with viability and cell necrosis obtained in each of the FC concentrations after 60 minutes of incubation and it shows that the greater the concentration, the lower the viability and the greater the cell necrosis (Table I). The correlation between the percentage of viable cells and necrosis showed a negative relationship  $r = -0.967$ .

TABLE I

PERCENTAGE OF VIABLE AND NECROTIC CELLS OBSERVED IN THE VARIOUS FC CONCENTRATIONS AFTER 60 MINUTES

Formocresol concentration	Viability (%)	Necrosis (%)
0	90	0.83
1:10	52	16.00
1:100	77	11.66
1:1000	84.66	6.33

Table II shows the percentage of cells with viability and cell apoptosis in each of the FS concentrations after 60 minutes of incubation. It shows that the greater the concentration, the lower the viability and the greater the cell apoptosis (Table II). The correlation between the percentage of viable cells and necrosis exhibited  $r = -0.967$ .

## DISCUSSION

The use of cultured cells in dental investigation work in order to evaluate the biocompatibility of the materials used has progressed over recent years, and we have

TABLE II

PERCENTAGE OF VIABLE AND APOPTOTIC CELLS OBSERVED IN THE VARIOUS FS CONCENTRATIONS AFTER 60 MINUTES

Ferric sulphate concentration	Viability (%)	Apoptosis (%)
0	88.40	3.625
1:100	69.25	10.750
1:1000	82.50	8.250
1:10000	93	4.62

been able to observe and quantify the disturbance suffered by every cell in a particular way when coming into contact with drugs or medication, restricting the number of variables (15).

The use of medication on vital tissues leads to an inflammatory-type response which induces, in the monocytes that have just reached the tissue as well as in the resident macrophages, proliferation and expansion. The macrophage that has been activated in this way experiences metabolic stimulation, which generates not only morphologic changes as it becomes larger, but also functional changes, as it acquires a greater capacity for adhesion, chemotaxis and phagocytosis, and especially for phagocytosing opsonized particles (19).

Cell viability is an important parameter for evaluating the quality of the experimental conditions *in vitro* and, in addition, it is the principal bioindicator of the success of cultured cells, and reliable data are guaranteed in cytotoxicity studies (20). For an initial evaluation of the toxicological aspects in response to different biomaterials, the cultured cell systems provide a convenient, controllable and repetitive medium.

In this study the percentage of viable macrophages in the control groups, after 24 hours of incubation, was maintained between 80-90%. In the experimental groups cell viability was affected in the groups with a greater FC concentrations (1:10, 1:100) and FS (1:100, 1:1000). The cell viability values for FC in the 1:10 concentration, suggest acute cell damage which was revealed also by the rate of cell necrosis. However this concentration (1:10) was not used for ferric sulphate as the change that was produced in the pH of the culture medium did not allow cell development. The FS concentrations used did not produce a significant descent in the percentage of viable cells, but the apoptosis index increased with the larger concentrations. These results could be explained as, in the early stage of apoptosis, there is no rupture of the cell membrane and this does not permit the stain (Trypan blue) to enter the cytoplasm.

Straffon and cols. (21,22), analyzed the effects of FC on the conjunctive tissue of hamsters and they observed a marked reduction in the number of inflammatory cells allowing rapid tissue recovery when the FC concentration was reduced.

Schweickl (23) analyzed the effect of a 20% FC solution on the primary molars of monkeys, suggesting that the former could be an alternative medication in vital

pulpotomies because, while the pulp certainly underwent changes, there was no evidence of tissue destruction or periapical lesions. The percentage of viable cells was similar in the groups that had the same concentration of FC and FS (1:100, 1:1000), however the type of cell death that each drug induces is different, and this was seen by morphologic evaluation. Although the greatest rates of cell necrosis were observed in the groups cultured with FC, the apoptosis rates increased in those incubated with FS.

Apoptosis and necrosis are two types of cell death that exhibit distinctive characteristics from the biochemistry and morphological point of view. However, these two forms of cell death were considered oppo-

sites, but they are now described as dynamic processes that interact, leading to cell death. Differentiating what type of cell death is induced by a certain drug will indicate what type of cell damage will arise. Studies in which incubation periods are extended and in which methods are used with greater sensitivity and specificity will be carried out to widen our existing knowledge.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

Our thanks to Srta. Mirta Alba Álvarez and Ldo. Juan Santiago Todaro for their constant technical advice.