

**AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO NO USO REPETIDO DE ANESTÉSICOS
LOCAIS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

MARILIZA CASANOVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO NO USO REPETIDO DE ANESTÉSICOS
LOCAIS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

MARILIZA CASANOVA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gisele Alborghetti Nai

636.089796 Oliveira, Mariliza Casanova.

O48a

Avaliação do dano genético no uso repetido de anestésicos locais: um estudo experimental em ratos / Mariliza Casanova de Oliveira. – Presidente Prudente, 2013.

53 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2013.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Anestésicos. 2. Teste para micronúcleos. 3. Odontologia. I. Título.

MARILIZA CASANOVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO NO USO REPETIDO DE ANESTÉSICOS
LOCAIS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Banca: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos
Faculdade de Odontologia de Bauru – FOUSP
Bauru - SP

Banca: Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Com muito carinho, dedico este trabalho aos meus queridos pais, Adilson e Marilene, aos meus irmãos Alexandre, André e Marcelo, que souberam compreender a minha ausência em momentos importantes... e continuaram me apoiando, motivando e inspirando a ser a melhor pessoa que eu posso ser. Muito obrigada! A imensidão do meu amor por vocês não pode ser expressa em palavras!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado o presente da vida e por sempre guiar o meu coração e a minha mente na direção certa.

Ao meu pai, Adilson, minha eterna fonte de inspiração e admiração, um exemplo de ser humano inteligente, ético, dedicado, incansável... mestre! Obrigada por todos os seus conselhos, apoio e seu carinho sempre que eu precisei.

À minha mãe, Marilene, meu exemplo de vida, pessoa linda com o coração mais puro que eu já conheci, exemplo de amor incondicional, meu porto seguro, minha fonte inesgotável de forças quando nada parece fazer sentido.

Aos meus irmãos, Alexandre, André e Marcelo, por todas as brincadeiras e brigas na infância que hoje nos tornam inseparáveis. Obrigada por sempre preocuparem tanto comigo, por cuidarem de mim e por sempre estarem presentes quando eu precisei. Amo vocês!

As minhas amigas, Daniela Rocha, Priscila Madeira, Fernanda Lemos, obrigada por todo o carinho, incentivo, positivismo, conselhos, prontidão e disposição que sempre tiveram em me ajudar, e que possibilitaram a conquista deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Gisele Alborghetti Nai, agradeço por me ensinar a conduzir e a redigir um trabalho experimental tão valioso e enriquecedor. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos, por deixar seus compromissos em sua cidade e aceitar fazer parte de minha banca. Pelas orientações, sugestões e conselhos que vieram enriquecer meu trabalho. Por compartilhar desse momento tão importante e de grande conquista. Muito obrigada!

“Live as if you were to die tomorrow. Learn as if you were to live forever”

– Mahatma Gandhi –

RESUMO

Avaliação do dano genético no uso repetido de anestésicos locais: um estudo experimental em ratos

Estudos com alguns anestésicos locais mostraram que estes podem causar dano genético. Porém ainda não foi testada a genotoxicidade frente ao uso repetido destes. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico de anestésicos locais em dose única e repetida, por meio do teste de micronúcleo em ratos Wistar. **Material e métodos:** Foram utilizados 80 ratos Wistar, machos, com 12 semanas, divididos em 6 grupos: A – 16 ratos receberam cloridrato de lidocaína via intraperitoneal (4,4 mg/kg); B – 16 ratos receberam mepivacaína a 3% via intraperitoneal (4,4 mg/kg); C – 16 ratos receberam articaína a 4% via intraperitoneal (7,0 mg/kg); D – 16 ratos receberam prilocaína a 3% via intraperitoneal (6,0 mg/kg); E – 08 ratos receberam ciclofosfamida em dose única subcutânea (50mg/kg) (grupo controle positivo); F – 08 ratos receberam 0,5ml de soro fisiológico via intraperitoneal (grupo controle negativo). Oito ratos do grupo A, B, C e D receberam a dose do anestésico apenas uma vez no primeiro dia do experimento e os demais receberam doses diárias durante cinco dias. O teste de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, foi utilizado para análise estatística. **Resultados:** A mediana de micronúcleos no grupo exposto a Lidocaína por 1 dia foi de 1.00 e por 5 dias foi de 0.50, a Mepivacaína por 1 dia e por 5 dias foi de 1.00, a Articaína por 1 dia 1.00 e por 5 dias 0.00, a Prilocaína por 1 dia e por 5 dias 0.00, a ciclofosfamida foi 10.00 e no grupo de controle negativo exposto por 1 dia foi 1,00 e no exposto por 5 dias foi de 0,00 ($p < 0,0001$). Houve diferença estatística entre o número de micronúcleos em relação ao grupo controle positivo e todos os anestésicos locais estudados (quanto ao tipo e tempo de exposição) ($p = 0,0001$), porém não em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). **Conclusão:** Não foi observado aumento da frequência de micronúcleos com relação à exposição de 1 ou 5 dias em todos os anestésicos locais avaliados.

Palavras-chave: Anestesia Local, Genotoxicidade, Testes de Mutagenicidade, Testes para micronúcleos.

ABSTRACT

Evaluation of genetic damage in repeated use of local anesthetics: an experimental study in rats

Studies with some local anesthetics showed that these can cause genetic damage. But local anesthetics has not been tested against the genotoxicity of repeated use.

Objective: The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of local anesthetics with single dose and repeated, through the micronucleus test. **Methods:** We used 80 Wistar rats, male, 12 weeks old, divided into 6 groups: A - 16 rats received lidocaine hydrochloride intraperitoneally (4.4 mg / kg), B - 16 rats received 3% mepivacaine intraperitoneally (4.4 mg / kg), C - 16 rats received 4% articaine intraperitoneally (7.0 mg / kg) D - 16 rats received prilocaine 3% intraperitoneally (6.0 mg / kg) E - 08 rats received cyclophosphamide in single subcutaneous dose (50mg/kg) (positive control group) F - 08 rats received 0.5 ml of saline intraperitoneally (negative control group). Eight rats from Group A, B, C and D received the dose of anesthetic only once at the first day of the experiment and the remainder were dosed daily for five days. The Kruskal-Wallis test followed by a multiple comparisons Student-Newman-Keuls test was used for statistical analysis.

Results: The median of micronuclei in the lidocaine group exposed for 1 day was 1.00 and by 5 days was 0.50, mepivacaine for 1 day and for 5 days was 1.00, articaine for 1 day was 1.00 and for 5 days 0.00, prilocaine for 1 day and 5 days was 0.00, cyclophosphamide was 10.00 and the negative control group exposed for 1 day was 1.00 and exposed for 5 days was 0.00 ($p < 0.0001$). There was a statistical difference between the number of micronuclei in relation to the positive control group and all local anesthetics studied (related to the anesthetic type and duration of exposure) ($p = 0.0001$) but not for the negative control group ($p > 0.05$). **Conclusion:** There was no increase in micronuclei frequency in relation to exposure to 1 or 5 days in all local anesthetics evaluated.

Key words: Anesthesia, Local, Genotoxicity, Mutagenicity Tests, Micronucleus Tests.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Anestésicos Locais.....	10
1.1.1 Anestésicos locais em odontologia	11
1.1.2 Efeitos adversos dos anestésicos locais	15
1.1.3 Anestésicos locais e genotoxicidade	15
1.2 A Importância da Mutagênese Ambiental na Carcinogênese Humana	17
1.2.1 Testes para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade	18
1.2.2 Teste do micronúcleo	20
REFERÊNCIAS.....	22
2 ARTIGO.....	26
ANEXOS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anestésicos locais

A anestesia local é definida como perda da sensibilidade de uma área circunscrita do corpo, causada pela depressão da excitação das terminações nervosas ou pela inibição do processo de condução dos nervos periféricos (MALAMED, 2005).

Os agentes que promovem anestesia local são quimicamente similares e bloqueiam reversivelmente a geração e a condução dos impulsos nervosos periféricos (BUTTERWORTH; STRICHARTZ, 1990).

Desde a antiguidade, a procura por substâncias que pudessem amenizar a sensação dolorosa já ocorria. Antes da descoberta dos anestésicos, também utilizavam - se outros meios para causar analgesia, como a asfixia temporária do paciente na qual se provocava uma isquemia cerebral e um desmaio momentâneo, ou então, o paciente era imobilizado pelos membros por quatro auxiliares e o cirurgião assim poderia realizar o seu procedimento (MALAMED, 2005).

Em 1860, Nieman utilizou o primeiro anestésico local na Medicina e Odontologia que era a cocaína. Von Srep, no ano de 1880, através de seus estudos descobriu os inúmeros benefícios da cocaína que logo passou a ser administrada com eficácia. Várias pesquisas tiveram início à procura de substitutos sintéticos para a cocaína, tendo Ein Horn, em 1905, sintetizado a procaína, que originou a descoberta dos anestésicos locais utilizados até os dias de hoje (TORTAMANO; ARMONIA, 2001).

A molécula típica do anestésico local é constituída por um grupo lipofílico (anel de benzeno) e um grupo hidrofílico (amina terciária), separado por uma cadeia intermediária que incluem ligação éster ou amida (WANNMACHER; FERREIRA, 1999). A função do grupo lipofílico (lipossolúvel) é facilitar a passagem da molécula pela membrana da célula nervosa, enquanto que o grupamento hidrofílico (ionizável) interage com o receptor celular. A importância dessa divisão se encontra na duração do efeito e no risco de reações alérgicas (WANNMACHER; FERREIRA, 1999).

Os anestésicos locais são bases orgânicas fracas, pobremente solúveis em água. Por isso, as soluções comerciais são preparadas como sais ácidos que o torna hidrossolúvel, que são geralmente obtidos por adição de ácido clorídrico. Assim, mesmo os agentes serem bases fracas, as preparações farmacêuticas são levemente ácidas, com o pH variando de 4,5 a 6,0 em tubetes odontológicos (WANNMACHER; FERREIRA, 1999).

Como mecanismo de ação, os anestésicos locais bloqueiam fisicamente por interações lipofílicas, os canais de sódio das membranas dos terminais dos neurônios. Como potencial de ação é dependente do influxo de sódio, ao não ocorrer não há propagação do sinal nervoso. São mais facilmente bloqueados os neurônios com axônios de menor diâmetro, o que permite ajustar a dose de forma a não inativar os neurônios motores (WANNMACHER; FERREIRA, 1999).

As soluções anestésicas possuem características próprias em relação ao período de latência, potência e duração da anestesia, assim a escolha da solução depende do tipo de procedimento a ser realizado e do estado geral de saúde do paciente (SOARES, 2002).

A indicação do uso de anestésico se encontra em operações simples que envolvem pequenas áreas, como as da área odontológica.

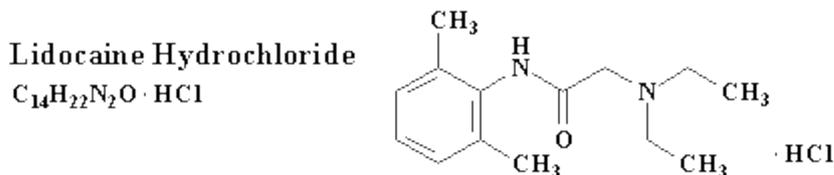
1.1.1 Anestésicos locais em Odontologia

O anestésico local é a droga mais frequentemente utilizada para controle da dor em Odontologia. Dentre as várias formulações de anestésicos locais, as mais comumente utilizadas são aquelas que contêm lidocaína, prilocaína, mepivacaína como sal anestésico (RANALI; ANDRADE; VOLPATO, 1996).

Vista como o anestésico padrão na Odontologia, a lidocaína (Figura 1), foi sintetizada em 1943 por Nils Lofgren. Sua ação inicia-se em torno de 2 a 3 minutos e tem eficácia em uma concentração de 2%. Sua dose máxima recomendada é de 4,4 mg/kg em adultos, não excedendo 300mg, 08 tubetes. É encontrada comercialmente nas concentrações de 1% e 2%, com ou sem vasoconstritor (fenilefrina, noradrenalina e adrenalina). Para aplicação tópica, sua concentração pode ser de 5% (VIEIRA; GONÇALVEZ; AGRA,

2000; MARIANO; SANTANA; COURA, 2000; DICIONÁRIO, 2004; MALAMED, 2005).

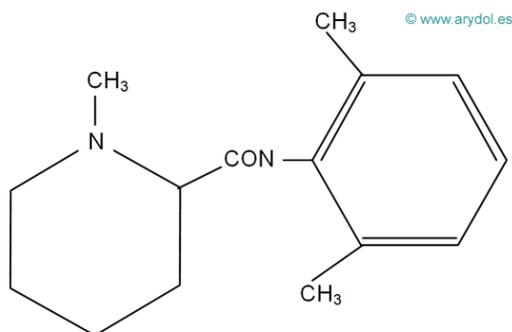
FIGURA 1 – Fórmula química da lidocaína



Fonte: LIDOCAINE... [2004?]

A mepivacaína (Figura 2), semelhante à lidocaína em termos de toxicidade, apresenta atividade vasodilatadora menor. Desta forma, na ausência do vasoconstritor a mepivacaína proporciona anestesia pulpar com duração de 20 a 40 minutos, enquanto que com o uso de lidocaína esta duração é de no máximo 10 minutos (MALAMED, 2005). Uma de suas vantagens é que esta substância consegue ter um tempo de ação maior do que os outros anestésicos sem o uso do vasoconstritor. É sintetizada apenas por laboratórios especializados em artigos odontológicos (PONZONI; SANCHES; OKAMOTO, 2003; DICIONÁRIO, 2004; MALAMED, 2005). No Brasil, a mepivacaína é comercializada na concentração de 3% sem vasoconstritor e de 2% em associação com a adrenalina (1:100.000), noradrenalina (1:100.000) e levonordefrina (1:20.000) (PONZONI; SANCHES; OKAMOTO, 2003; DICIONÁRIO, 2004; MALAMED, 2005). Sua dose máxima recomendada é de 4,4 mg/kg em adultos, não excedendo 300mg, sendo nas concentrações de 2% - 08 tubetes e para as de 3% - 05 tubetes. Na odontologia atual, o uso de mepivacaína é restrito e sem associação com vasoconstritor. A indicação do seu uso é para pacientes gestantes ou com doenças sistêmicas que contra indicam o uso de vasoconstritor, por ser o anestésico local com maior duração no tempo de anestesia sem o uso desta droga adjuvante.

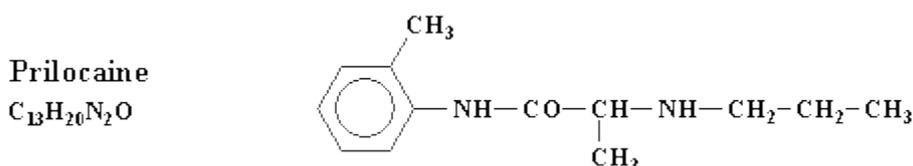
FIGURA 2 – Fórmula química da mepivacaína.



Fonte: Zaric et al. (2005)

A prilocaína foi sintetizada pela primeira vez em 1953 por Lofgren e Tegnér, tendo seu reconhecimento descrito apenas em 1960 (Figura 3). Apresenta-se com uma potência e toxicidade duas vezes maior que a lidocaína e um início de ação mais retardado, por volta de 2 a 4 minutos. É encontrada na concentração 3% onde sua dose máxima recomendada é de 6,0 mg/kg não podendo exceder 400mg ou 07 tubetes de anestésicos no paciente adulto (MALAMED, 2005).

FIGURA 3 – Fórmula química da prilocaína

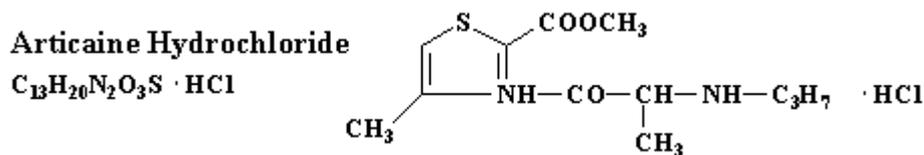


Fonte: PRILOCAINE... [2002?]

A articaína é o um anestésico do tipo amida que possui um anel tiopental como sua porção lipofílica (Figura 4). Isto lhe confere extrema lipossolubilidade e difusibilidade. Em comparação com a lidocaína, é 1,5 vezes mais potente, com uma toxicidade bem menor (0,6) (DICIONÁRIO, 2004); MIKESSELL et al., 2005). A articaína teve sua aprovação nos Estados Unidos em abril de 2000, tendo como nome comercial Steptocaine 4% com 1:100.000 de vasoconstrictor adrenalina. Sua dose máxima recomendada é de 7,0 mg/kg,

devendo não ultrapassar 500mg ou 08 tubetes (DICIONÁRIO, 2004; MIKESELL et al., 2005).

FIGURA 4 – Fórmula química da articaína



Fonte: ARTICAINE... [2002?]

Devido às propriedades vasodilatadoras da maioria dos sais anestésicos, quando estes últimos são utilizados isoladamente, nem sempre a duração da anestesia é adequada, tornando necessária a adição de um vasoconstritor. Por isso, é de grande importância citar o papel dos vasoconstritores, que no passado atribuíam várias desvantagens a eles decorrentes de seu uso inadequado como: injeções intravasculares, concentrações elevadas, aplicações rápidas e grandes volumes levando a intoxicação. Atualmente, sabe-se que quase nenhuma solução anestésica teria efeito sem o emprego dos vasoconstritores que dentre algumas vantagens destacam-se: absorção lenta do sal anestésico (que reduz a toxicidade deste e aumenta a duração da anestesia), e possibilita menores quantidades da solução e aumenta o efeito anestésico (MARIANO; SANTANA; COURA, 2000).

A combinação de um vasoconstritor com um agente anestésico local ocorreu pela primeira vez em 1901, quando Braun associou a adrenalina com a cocaína. Desde então muitos vasoconstritores tornaram-se disponíveis para o uso em Odontologia (JASTAK; YAGIELA, 1983). Os mais utilizados em associação com os anestésicos locais pertencem ao grupo das aminas simpatomiméticas, incluindo a adrenalina, a noradrenalina, a levonordefrina, a fenilefrina e a felipressina (PERUSSE; GOULET; TURCOTTE, 1992).

1.1.2 Efeitos adversos dos anestésicos locais

A intoxicação por anestésicos locais é a reação adversa mais conhecida na área odontológica. Os sinais e sintomas típicos por intoxicação ocorrem no Sistema Nervoso Central (SNC) e no Sistema Cardiovascular, sendo o primeiro o alvo de respostas tóxicas mais frequentes. Alterações precoces podem ser manifestadas tendo como sintomas problemas gustativos, auditivos e visuais; queda do nível de consciência, convulsões, podendo chegar até ao coma (MALAMED,1997).

Um dos principais mecanismos envolvidos no processo de toxicidade dos anestésicos locais é a elevação da concentração plasmática dessas drogas em um período de tempo curto. Isso se dá por injeção intravascular inadvertida, absorção maior do que a esperada em certas vias ou por doses excessivas (MALAMED, 1997). A via de administração, condições clínicas pré-existentes (como a insuficiência hepática), condições fisiológicas (gravidez), idade, alterações do equilíbrio ácido-básico dentre outros, também podem predispor à intoxicação (MALAMED, 1997).

1.1.3 Anestésicos locais e genotoxicidade

Genotoxicidade é a ação nociva que afeta a integridade de uma célula e do material genético. As substâncias genotóxicas são todas as que têm como afinidade para interagir com o DNA, o que não constitui necessariamente uma prova de periculosidade em relação à saúde, mas são potencialmente mutagênicos ou cancerígenos, especialmente aqueles capazes de causar uma mutação genética contribuindo para o desenvolvimento de tumores (SMITH, 1996).

A lidocaína e a prilocaína são principalmente metabolizadas no fígado, mas não pelas amidases plasmáticas. Após a hidrólise por ésteres de amida, a lidocaína e a prilocaína liberam as aminas aromáticas monocíclicas, 2,6-dimetilalanina (DMA) e 2-metilalanina (MA), respectivamente (DUAN; JEFFREY; WILLIAMS, 2008).

A lidocaína e a prilocaína têm sido testadas para carcinogenicidade. A prilocaína, desde outubro de 2007, em passado por testes

de micronúcleos pelo Programa Nacional de Toxicologia (DUAN; JEFFREY; WILLIAMS, 2008).

O principal mecanismo de carcinogenicidade de aminas aromáticas, tais como, DMA e MA, acontece por metabolização do citocromo P450, para os derivados de N-hidroxila. Estes produtos podem ser metabolizados por conjugação para produzir metabólitos reativos (DUAN; JEFFREY; WILLIAMS, 2008). Outros anestésicos que também contêm a fração de DMA, tais como, bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína, ainda estão em uso corrente, embora a ropivacaína não ser metabolizada para DMA em seres humanos (DUAN; JEFFREY; WILLIAMS, 2008).

O DMA e o MA podem ser posteriormente metabolizados por conjugação a metabólitos reativos. A lesão de DNA por DMA tem sido descrita, mas não por MA. A alteração do DNA é reconhecida como um possível mecanismo pelo qual estes compostos exercem alguns de seus efeitos cancerígenos (PRESTON; WILLIAMS, 2005).

Os resultados obtidos revelaram que apenas a Prilocaína exhibe a atividade genotóxica em células somáticas, sendo capaz de induzir exclusivamente a recombinação homóloga. Além disso, o efeito genotóxico atribuído a Prilocaína parece não estar relacionado com metabólitos produzidos por meio de enzimas P450. No entanto, a lidocaína e a articaína (Septanest) são incapazes de induzir efeitos relacionados com a genética cromossômica, mutação ou recombinação (SCHNEIDER et al., 2009).

As porcentagens de células com poliploidia ou endoreduplicação, foram reforçadas por cloridrato de prilocaína e cloridrato de procaína na ausência ou presença de ativação metabólica exógena. Os resultados indicam que estes agentes químicos que tiveram uma resposta positiva são potencialmente genotóxicos para células de mamíferos (HAGIWARA et al., 2006).

Quatro amostras de mutagenicidade in vitro e in vivo, não revelaram potencial mutagênico até a dose máxima tolerada para articaína (CAS 23964-58-1) e sua respectiva preparação (Septanest[®] SP; 4% articaína HCl e epinefrina 1: 100,000) (LEUSCHNER; LEBLANC, 1999).

Em outro estudo, observou-se que condensação nuclear e a fragmentação da cromatina estavam presentes em células tratadas com

prilocaína. A formação de fragmentos de DNA também foi induzida pelo tratamento com prilocaína. A prilocaína induz a formação de fragmentos de DNA dependente da dose, com efeito máximo na concentração de 5 mM e foi dependente do tempo de 12-48 horas (NAKAMURA et al., 1999).

Mutagenicidade é definida como mudança ou alteração gênica ou inibição ou dano do mecanismo de reparação do DNA, o que resulta em uma célula alterada. Testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (RIBEIRO, 2003).

Genotoxicidade não é uma medida indicadora de carcinogenicidade, pois seus estudos consistem na ação dos efeitos adversos físicos e químicos junto ao material genético das células (DNA ou cromossomos) e suas subseqüentes expressões de tais alterações (RIBEIRO, 2003).

Carcinogenicidade é a propriedade que tem uma substância de provocar alterações responsáveis pela indução do câncer. Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pela qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO, 2003).

A toxicidade genética não é uma medida da carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento principal ou intermediário de tumorigênese (RIBEIRO, 2003).

1.2 A Importância da Mutagênese Ambiental na Carcinogênese Humana

A mutagênese ambiental (genética toxicológica) avalia os efeitos genotóxicos em potencial, pois são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (RIBEIRO, 2003).

As causas do câncer são variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, estando, no entanto, inter-relacionadas. As causas exógenas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um

ambiente social e cultural. As causas endógenas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas a capacidade do organismo de se defender das agressões externas (RIBEIRO, 2003).

De todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados a fatores ambientais, alguns deles são bem conhecidos como cigarro e câncer de pulmão, exposição excessiva ao sol e câncer de pele, outros estão sendo avaliados como alguns componentes alimentares e outros ainda são completamente desconhecidos (RIBEIRO, 2003).

É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente ou devido a hábitos e vícios, como elitismo e tabagismo, devido à possibilidade de que a ação mutagênica venha a manifestar-se somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou teratogênese, caracterizando os chamados efeitos cumulativos (MARTINS, 2002).

1.2.1 Testes para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade

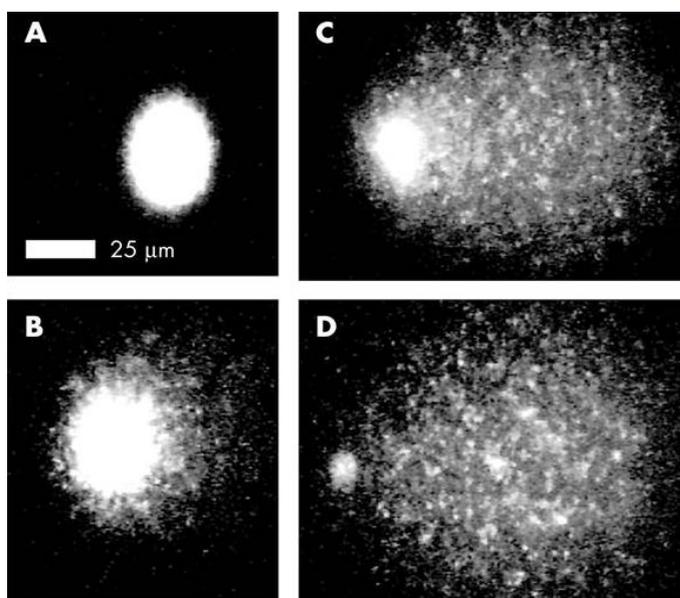
Testes de genotoxicidade dispõem de diversas metodologias que os tornam importantes para pesquisa e avaliação de toxicidade celular podendo identificar potenciais carcinogênicos e mutagenicidade. Os testes atuam em um sistema experimental, divididos em quatro níveis, onde o primeiro nível engloba ensaios moleculares e em bactérias (avaliação de mutação em gene bacteriano); o segundo nível consiste em provas *in vitro* em células de cultivo (avaliação de aberrações cromossômicas); o terceiro nível compreende análises *in vivo* (avaliação de mutações gênicas em células de mamíferos); o quarto e último nível correspondem aos estudos em populações expostas a materiais genotóxicos (CRUZ; FREITAS, 2010).

Várias técnicas podem ser utilizadas para testes, tais como: coeficiente DNA/proteína, atividade de enzimas mitocondriais, proliferação celular, quebras e reparo de DNA, índices mitóticos, identificação de danos, aberrações cromossômicas, não disjunções, detecção de apoptose e necrose (CRUZ; FREITAS, 2010). Dentre os principais testes estão:

1. Teste de Ames: este teste fundamenta-se na restauração ou compensação de um defeito genético específico que causa exigência a um determinado nutriente. A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após exposição de uma população a um agente mutagênico. Este teste permite a monitorização da ação direta sobre o material genético e a verificação da atividade positiva e ou negativa de metabólitos após biotransformação, semelhante ao o que ocorreria nos fígados dos mamíferos (CRUZ; FREITAS, 2010);

2. Eletroforese para célula única em gel (SCGE) ou “Teste do Cometa”: consiste na quantificação de danos em DNA de células embebidas em gel de agarose, permite a detecção de danos e reparos em uma única célula. Suas vias de reparo de DNA podem ocorrer das seguintes formas: reversão da lesão, reparo por excisão, reparo recombinacional e tolerância a lesões (Figura 5) (CRUZ; FREITAS, 2010);

FIGURA 5 - Teste do Cometa mostrando vários graus de danos ao DNA: A - célula sem dano; B - célula com pequenos danos; C - célula danificada com o clássico “Cometa”; D - célula completamente danificada.

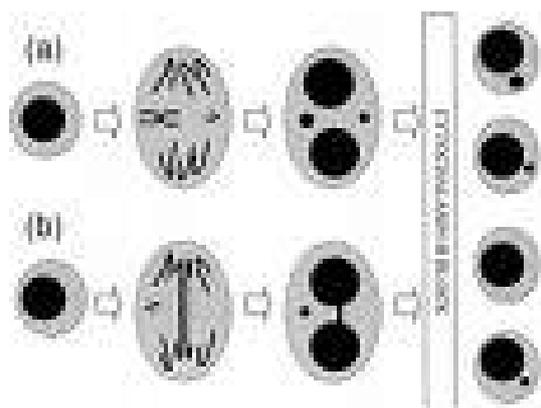


Fonte: Lebailly et al. (2003)

3. Teste do micronúcleo: o micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular por cromossomos ou

seus fragmentos que se atrasam em relação aos demais (Figura 6). Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas ou ainda, falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (RAMIREZ; SALDANHA, 1998; OLIVEIRA, 2010).

FIGURA 6 – Formação de uma célula micronucleada.



Fonte: Ribeiro (2003)

1.2.2 Teste do micronúcleo

O termo “teste de micronúcleo” foi sugerido pela primeira vez em 1970 por Boller e Schmid e posteriormente por Heddle em 1977 (EVANS, 1997; OLIVEIRA, 2010).

O teste do micronúcleo detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (FLORES; YAMAGUCHI, 2008; OLIVEIRA, 2010).

Nos trabalhos utilizando eritrócitos de ratos, a quantificação do DNA de micronúcleos mostrou que a quantidade correspondia a de cromossomos ou de fragmentos de cromossômicos acêntricos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Atualmente o teste de micronúcleo é ferramenta amplamente utilizada para pesquisa e aferição da segurança de inúmeras substâncias,

classificando-as ou não como carcinogênicas, fornecendo resultados com forte suporte estatístico (FENECH et al., 1999).

A facilidade da sua realização leva a ampla adoção mundial como teste de genotoxicidade *in vitro* assim como no monitoramento da população humana (KERN, 2006; RIBEIRO, 2003).

O teste de micronúcleo tem sido usado extensivamente em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois os micronúcleos são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Os testes de micronúcleo podem ser realizados: 1. *in vivo*: onde ocorre a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) e é desenvolvido em eritrócitos de medula óssea (camundongos, ratos); 2. *in vitro*: caracterizado pela identificação de células que completaram uma divisão nuclear, como análise de linfócitos coletados do sangue periférico (VILLELA et al., 2003; RIBEIRO, 2003; OLIVEIRA, 2010).

O teste de micronúcleo possui como vantagens a análise mais simples quando comparadas a outros testes, serve para diagnóstico de doenças e monitoramento ambiental, alta sensibilidade e precisão, detecção de perdas cromossômicas e de não-disjunções, medidas de extensão e progressão da divisão nuclear e detecção de eventos de reparo por excisão (VILLELA et al., 2003; RIBEIRO, 2003).

A literatura não apresenta trabalhos que avaliem o potencial genotóxico dos anestésicos locais em uso repetido. Os anestésicos locais são substâncias amplamente usadas em Odontologia e Medicina e estudos que avaliem o risco da exposição repetida a estas poderão contribuir para melhor compreensão do seu efeito tóxico sobre os genes e o risco dos pacientes expostos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico de anestésicos locais em dose única e repetida, por meio do teste de micronúcleo em ratos Wistar.

REFERÊNCIAS

- ARTICAINE hydrochloride C₁₃H₂₀N₂O₃SHCl: chemical formula. [2002?]. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/articaine-epinephrine>. Acesso em: 27 nov. 2012.
- BUTTERWORT, J. F.; STRICHARTZ, G. R. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiology**, v. 72, n. 4, p. 711-734, 1990.
- CRUZ, A. B.; FREITAS, R. A. **Toxicologia in vitro: principais modelos utilizados**. Disponível em: http://www.vsiptm.com.br/html/arquivos_menu2/cursos/Curso_7_2.pdf. Acesso em: 05 abr. 2011.
- DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas 2004/2005. 33.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2004.
- DUAN, J. D.; JEFFREY, A. M.; WILLIAMS, G. M. Assessment of the medicines Lidocaine, Prilocaine, and their metabolites, 2,6-Dimethylaniline and 2-methylaniline, for DNA adduct formation in rat tissues. **Drug Metabolism and Disposition Journal**, v. 36, n. 8, p.1470-1475, ago. 2008. Disponível em: <http://dmd.aspetjournals.org>. Acesso em: 10 ago. 2011.
- EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. **Mutat. Res.**, n. 392, p. 5-10, 1997.
- FENECH, M. et al. The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat Res**, n. 428, p. 271-83, 1999.
- FLORES, M.; YAMAGUCHI, U. M. Teste de Micronúcleo : uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.
- HAGIWARA, M. et al. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. **Mutat Res.**, v. 603, n. 2, p. 111-20, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406784>>. Acesso em: 10 jul. 2011.
- JASTAK, J. T.; YAGIELA, J. A. Vasoconstrictors and local anesthesia: a review and rationale for use. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 107, n.4, p. 623 – 630, Oct. 1983.
- KERN, R. **Avaliação de micronúcleos em células epiteliais bucais em estudantes de odontologia**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- KIRSCH-VOLDERS, M. et al. _Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutat Res.**, v. 540, n. 2, p. 153-63, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550499>. Acesso em: ago. 2011.

LEBAILLY, P. et al. Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. **Occup Environ Med.**, n. 60, p. 910-917, 2003. Disponível em: <http://www.accessmylibrary.com/article-1G1-111496361/urine-mutagenicity-and-lymphocyte.html>. Acesso em: ago. 2011.

LEUSCHNER, J.; LEBLANC, D. Studies on the toxicological profile of the local anaesthetic articaine. **Arzneimittelforschung**, v. 49, n. 2, p. 126-32, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10083981?dopt=Abstract>. Acesso em: Jul. 2011.

LIDOCAINE Hydrochloride C₁₄H₂₂N₂OHCl: chemical formula. [2004?]. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/lidocaine>. Acesso em: nov. 2012.

MALAMED, S. F. **Handbook of local anesthesia**. 4.ed. St. Louis: Mosby, 1997.

MALAMED, S. F. **Manual de anestesia local**. 5.ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

MARIANO, R. C.; SANTANA, S. I.; COURA, G. S. Análise comparativa do efeito anestésico da lidocaína 2% e da prilocaína 3%. **BCI**, Curitiba, v. 7, n. 27, p. 15-19, jul./set. 2000.

MARTINS, D. I. **Exposição ocupacional a solventes orgânicos em trabalhadores de laboratórios e efeitos genotóxicos**. 2002. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MIKESELL, P. et al. A comparison of articaine and lidocaine of inferior alveolar nerve blocks. **J Endod.**, Baltimore, v. 31, n. 4, p. 265-270, Apr. 2005

NAKAMURA, K. et al. Prilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. **Can J Anaesth.**, v. 46, n. 5, pt. 1, p. 476-82, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10349929>. Acesso em: 10 jul. 2011.

OLIVEIRA, R. J. **Genética toxicológica e meio ambiente: uma abordagem teórico - prática**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/65685258/EcoToxMicronucleo>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

PERUSSE, R.; GOULET, J. P.; TURCOTTE, J. Y. Contraindications to vasoconstrictors in dentistry : part I. **Oral Surg. Oral med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 74, n. 5, p. 679-686, nov. 1992.

PONZONI, D.; SANCHES, M. G.; OKAMOTO, T. Influência de solução anestésica local contendo mepivacaína no processo de reparo em feridas de extração dental: análise histológica em ratos. **Revista da Associação**

Brasileira de Odontologia Nacional, São Paulo, v. 11, n. 5, p. 287-292, out./nov. 2003.

PRESTON, R. J., WILLIAMS, G. M. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard. **Critical Reviews in Toxicology**, Londres, v. 35, p. 673-683, 2005.

PRILOCAINE C₁₃H₂₀N₂O: chemical formula. [2002?]. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/prilocaine>. Acesso em: 27 nov. 2012.

RAMÍREZ, A.; SALDANHA, P. H. Análise crítica de grupos controle no teste de micronúcleo na mucosa bucal. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, n. 3, p. 140, 1998.

RANALI, J.; ANDRADE, E. D.; VOLPATO, M. C. Profilaxia, tratamento e controle do paciente com doença sistêmica ou que requer cuidados especiais. In: GONÇALVES, E. A. N.; FELLER, C. (Coord.). **Atualização na clínica odontológica**. São Paulo: Artes Médicas, 1996.

RIBEIRO, R. L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, R. L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese ambiental**. 1.ed. Canoas: ULBRA, 2003. cap. 7, p. 173-200.

SCHNEIDER, L. E. et al. Assessment of genotoxicity of Lidocaine, Prilonest and Septanest in the drosophila Wing-Spot test. **Food Chem Toxicol.**, v. 47, n. 1, p. 205-8, jan. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027815>. Acesso em: jul. 2011.

SMITH, M. T. The mechanism of benzene-induced leukemia : a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. **Environ Health Perspect**, n. 104, supl. 6, p. 1219-1225, 1996. Disponível em: <http://ehp03.niehs.nih.gov/article/fetchArticle.action;jsessionid=B0F7346F00CEA1BF98660CFB53B4B03A?articleURI=info%3Adoi%2F10.1289%2Fehp.96104s61219>. Acesso em: 02 set. 2011.

SOARES, P. C. O. **Avaliação dos parâmetros cardiovasculares pré, trans e pós anestesia local em pacientes normotensos**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.

TORTAMANO, N.; ARMONIA, P. L. **Guia terapêutico odontológico**. 14.ed. São Paulo: Ed. Santos, 2001. cap. 4: Anestésicos locais, p.30-41.

VIEIRA, G. F.; GONÇALVES, E. A. N.; AGRA, C. M. Anestesia odontológica: segurança e sucesso : parte 1. **Revista Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 42-45, jan./fev. 2000.

VILLELA, I. V. et al. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica para dentistas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

ZARIC, D.; CHRISTIANSEN, C.; Pace, N. L.; PUNJASAWADWONG, Y.;
Sintomas neurológicos transitórios após raquianestesia com lidocaína versus
outros anestésicos locais: uma revisão sistemática de estudos controlados e
randomizados. **Anesthesia & Analgesia**, v. 100, n.6, p.1811-6, jun. 2005.
Disponível em: <http://www.arydol.es/neuroestimulacion-anesteticos-locales.php>
Acesso em: out. 2012.

2 ARTIGO

AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO NO USO REPETIDO DE ANESTÉSICOS LOCAIS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

EVALUATION OF GENETIC DAMAGE IN REPEATED USE OF LOCAL ANESTHETICS: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

**Mariliza Casanova de Oliveira¹, Graziela de Oliveira Tavares², Laís
Fabrício Fonseca Pereira², Nádia Derli Salvador Lemes Soares³,
Patrícia Gatti Silva³, Gisele Alborghetti Nai⁴.**

¹Discente de Mestrado, Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Discente de graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente (FOPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Discente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

⁴Doutora, professora do Departamento de Patologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br.

Resumo

Contexto: Estudos com alguns anestésicos locais mostraram que estes podem causar dano genético. Porém ainda não foi testada a genotoxicidade frente ao uso repetido destes.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico de anestésicos locais em dose única e repetida, por meio do teste de micronúcleo em ratos wistar.

Animais: Medula óssea do fêmur de 80 ratos Wistar albinos, machos, com 12 semanas.

Intervenções: Foram utilizados 80 ratos Wistar, machos, com 12 semanas, divididos em 6 grupos: A – 16 ratos receberam cloridrato de lidocaína via intraperitoneal (4,4 mg/kg); B – 16 ratos receberam mepivacaína a 3% via intraperitoneal (4,4 mg/kg); C – 16 ratos receberam articaína a 4% via intraperitoneal (7,0 mg/kg); D – 16 ratos receberam prilocaína a 3% via intraperitoneal (6,0 mg/kg); E – 08 ratos receberam ciclofosfamida em dose única subcutânea (50mg/kg) (grupo controle positivo); F – 08 ratos receberam 0,5ml de soro fisiológico via intraperitoneal (grupo controle negativo).

Principais medidas de resultado: Oito ratos do grupo A, B, C e D receberam a dose do anestésico apenas uma vez no primeiro dia do experimento e os demais receberam doses diárias durante cinco dias.

Resultados: A mediana de micronúcleos no grupo exposto a Lidocaína por 1 dia foi de 1.00 e por 5 dias foi de 0.50, a Mepivacaína por 1 dia e por 5 dias foi de 1.00, a Articaína por 1 dia 1.00 e por 5 dias 0.00, a Prilocaína por 1 dia e por 5 dias 0.00, a ciclofosfamida foi 10.00 e no grupo de controle negativo exposto por 1 dia foi 1,00 e no exposto por 5 dias foi de 0,00 ($p < 0,0001$). Houve diferença estatística entre o número de micronúcleos em relação ao grupo controle positivo e todos os anestésicos locais estudados (quanto ao tipo e tempo de exposição) ($p = 0,0001$), porém não em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$).

Conclusão: Não foi observado aumento da frequência de micronúcleos com relação à exposição de 1 ou 5 dias em todos os anestésicos locais avaliados.

Palavras-chave: Anestesia Local, Genotoxicidade, Testes de Mutagenicidade, Testes para micronúcleos.

Abstract

Context: Studies with inhaled anesthetics and some local anesthetics showed that these can cause genetic damage. But local anesthetics has not been tested against the genotoxicity of repeated use.

Objective: The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of local anesthetics with single dose and repeated, through the micronucleus test.

Animals: Femoral bone marrow of 80 Wistar rats, male, 12 weeks.

Interventions: We used 80 Wistar rats, male, 12 weeks old, divided into 6 groups: A - 16 rats received lidocaine hydrochloride intraperitoneally (4.4 mg / kg), B - 16 rats received 3% mepivacaine intraperitoneally (4.4 mg / kg), C - 16 rats received 4% articaine intraperitoneally (7.0 mg / kg) D - 16 rats received prilocaine 3% intraperitoneally (6.0 mg / kg) E - 08 rats received cyclophosphamide in single subcutaneous dose (50mg/kg) (positive control group) F - 08 rats received 0.5 ml of saline intraperitoneally.

Main outcome measures: Eight rats from Group A, B, C and D received the dose of anesthetic only once at the first day of the experiment and the remainder were dosed daily for five days.

Results: The median of micronuclei in the lidocaine group exposed for 1 day was 1.00 and by 5 days was 0.50, mepivacaine for 1 day and for 5 days was 1.00, articaine for 1 day was 1.00 and for 5 days 0.00, prilocaine for 1 day and 5 days was 0.00, cyclophosphamide was 10.00 and the negative control group exposed for 1 day was 1.00 and exposed for 5 days was 0.00 ($p < 0.0001$). There was a statistical difference between the number of micronuclei in relation to the positive control group and all local anesthetics studied (related to the anesthetic type and duration of exposure) ($p = 0.0001$) but not for the negative control group ($p > 0.05$).

Conclusion: There was no increase in micronuclei frequency in relation to exposure to 1 or 5 days in all local anesthetics evaluated.

Key words: Anesthesia, Local, Genotoxicity, Mutagenicity Tests, Micronucleus Tests.

Introdução

O desenvolvimento seguro e eficaz de agentes anestésicos locais tem sido possivelmente o avanço mais importante na ciência dental que ocorreu no século passado. Os agentes atualmente disponíveis na Odontologia são extremamente seguros e preenchem a maior parte das características de um anestésico local ideal. Estes agentes anestésicos locais pode ser administrados com irritação mínima do tecido e com pouca probabilidade de induzir reações alérgicas.¹

O anestésico local é a droga mais frequentemente utilizada para controle da dor em Odontologia, além de ser amplamente utilizada em Medicina. Dentre as várias formulações de anestésicos locais, as mais comumente utilizadas são: lidocaína, prilocaína e mepivacaína como sal anestésico.²

A combinação de um vasoconstritor com um agente anestésico local ocorreu pela primeira vez em 1901, quando Braun associou a adrenalina com a cocaína.³ Esta combinação permite absorção lenta do sal anestésico, o que reduz a toxicidade deste e aumenta a duração da anestesia.¹

Genotoxicidade é a ação nociva que afeta a integridade de uma célula e do material genético. As substâncias genotóxicas são todas as que têm como afinidade interagir com o DNA, o que não constitui necessariamente uma prova de periculosidade em relação à saúde, mas são potencialmente mutagênicos ou cancerígenos.⁴

Alguns anestésicos locais ainda não foram testados para carcinogenicidade e genotoxicidade. A prilocaína é um dos anestésicos locais mais testados, e desde outubro de 2007, tem passado por testes de micronúcleos pelo *National Toxicology Programe* (NTP, EUA).⁵

O teste do micronúcleo é um dos testes amplamente utilizados para avaliação de genotoxicidade. Este teste detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular.⁶ É ferramenta amplamente utilizada para pesquisa e aferição da segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como carcinogênicas, fornecendo resultados com forte suporte estatístico.⁷ A facilidade da sua realização leva a ampla adoção mundial como teste de genotoxicidade assim como no monitoramento da população humana.⁸

A literatura não apresenta trabalhos que avaliem o potencial genotóxico do uso repetido dos anestésicos locais. Os anestésicos locais são substâncias amplamente usadas em Odontologia e Medicina e estudos que avaliem o risco da exposição repetida a estas substâncias poderão contribuir para melhor compreensão do seu efeito tóxico sobre os genes e o risco dos pacientes expostos.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial genotóxico do uso repetido dos anestésicos locais, por meio do teste do micronúcleo.

Métodos

Para este estudo, foram utilizados 80 ratos Wistar albinos, machos, com 12 semanas e peso entre 200 a 250g. Os ratos foram separados e agrupados em número de quatro em caixas grandes retangulares, medindo 49x34x16cm, preconizadas para alojamento de cinco ratos adultos. Os ratos foram colocados em biotério climatizado em umidade e temperatura, e equipado com ciclo de 12 horas de claro e escuro. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram pesados para cálculo da dose anestésica.

Os animais foram divididos em 6 grupos: A – 16 ratos que receberam cloridrato de lidocaína com felinefrina (Novocol[®] 100, SSWhite, Rio de Janeiro - Brasil) via intraperitoneal, na dose de 4,4 mg/kg; B – 16 ratos receberam Mepivacaína a 2% (mepivacaína, DFL, Jacarepaguá - Brasil) via intraperitoneal na dose de 4,4 mg/kg; C – 16 ratos receberam Articaina e epinefrina a 4% (Septanest[®] 1: 100,000, Septodont, Bruxelas - Bélgica) via intraperitoneal, na dose de 7,0 mg/kg; D – 16 ratos receberam prilocaína com felipressina a 3% (Cytanest[®], Astra, São Paulo - Brasil) via intraperitoneal na dose de 6,0 mg/kg; E – 08 ratos receberam ciclofosfamida (Genuxal[®], Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen, Alemanha) em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento (grupo controle positivo),⁸ F – 08 ratos receberam 0,5ml de soro fisiológico via intraperitoneal (Tabela 1).

TABELA 1 – Descrição dos grupos de estudo.

Grupo	Nº de ratos	Droga utilizada	Vasoconstritor	Dose recomendada
A	16	Novocol [®] 100/ Cloridrato de Lidocaína	Felinefrina	4,4 mg/kg
B	16	Mepivacaína a 2%/ Mepivacaína	Sem vasoconstritor	4,4 mg/kg
C	16	Septanest [®] a 4%/ Articaína	Epinefrina 1:100.000	7,0 mg/kg
D	16	Cytanest [®] a 3%/ Prilocaína	Felipressina	6,0 mg/kg
E	08	Ciclosfosfamida	Grupo controle negativo	50 mg/kg
F	08	Água e ração <i>ad libitum</i>	Grupo controle negativo	0,5 ml soro fisiológico

A ciclofosfamida foi usada como controle positivo, pois na concentração de 50 ml/kg, esta droga causa formação de micronúcleos.⁸

Oito ratos do grupo A, oito do grupo B, oito do grupo C e oito do grupo D receberam a dose do anestésico apenas uma vez no primeiro dia do experimento. Os outros animais desses dois grupos receberam doses diárias durante cinco dias. O mesmo se sucedeu para os ratos do grupo F, porém com administração de soro fisiológico.

Oito ratos do grupo A, oito do grupo B, oito do grupo C, oito do grupo D, quatro ratos do grupo F e todos do grupo E foram eutanasiados 24 horas após o início do experimento. Os demais animais dos grupos A, B, C, D e F foram eutanasiados 5 dias após o início do experimento. A eutanásia foi realizada com Tiopental (Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil), na dose de 100 mg/Kg administrado na cavidade peritoneal.⁹

Foi coletado material da medula óssea do fêmur de cada rato no momento da eutanásia, sempre no mesmo horário, e foram realizadas duas lâminas por animal.⁸

As lâminas foram coradas pelo corante de Giemsa (Dolles, São Paulo, Brasil). Para determinação do número de micronúcleos foram contados 2000 eritrócitos policromáticos por animal (1000 em cada lâmina) utilizando-se microscópio óptico, no aumento de 400x.⁸ Micronúcleos foram considerados como uma estrutura com a membrana circundante, menores de um terço do diâmetro do núcleo associado, semelhante na intensidade de coloração e microscopia no mesmo plano focal do núcleo associado.¹⁰

A análise das lâminas foi cega e realizada por um avaliador (MCO) e revisada por outro observador (GAN), que concordou com os resultados.

Análise estatística

A variável frequência de micronúcleos não apresentou normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,000$) e também não apresentou homogeneidade das variâncias ($p=0,004$) pelo teste de Levene, e, portanto, optou-se pelo uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Os testes estatísticos foram realizados com 5% de significância.

Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE) (Protocolo nº 930/11).

Resultados

A mediana de micronúcleos no grupo exposto a Lidocaína por 1 dia foi de 1.00 e por 5 dias foi de 0.50, a Mepivacaína por 1 dia e por 5 dias foi de 1.00, a Articaína por 1 dia 1.00 e por 5 dias 0.00, a Prilocaína por 1 dia e por 5 dias 0.00, no grupo exposto a ciclofosfamida (controle positivo) foi 10.00 e no grupo de controle negativo exposto por 1 dia foi 1,00 e no exposto por 5 dias foi de 0,00 ($p<0,0001$) (Figuras 1 e 2 e Tabela 2).

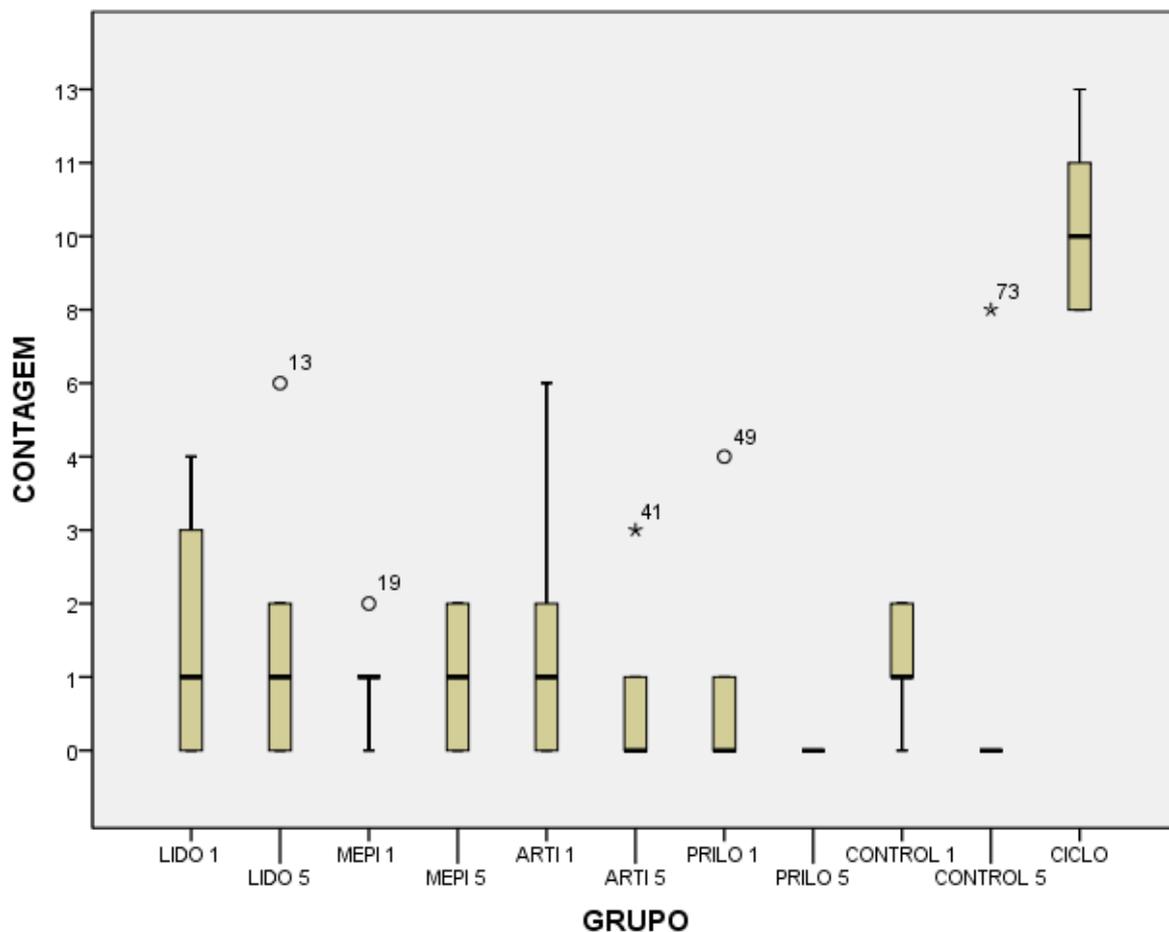


Figura 1 – Contagem de micronúcleos por grupo estudado (mediana e interquartis). LIDO: lidocaína; MEPI: mepivacaína; ARTI: articaína; PRILO: prilocaína; CONTROL: controle negativo; CICLO: ciclofosfamida (controle positivo); 1: exposição por 1 dia; 5: exposição por 5 dias. °: *outlier*; *: *outlier do outlier*; a numeração sobre o *outlier* corresponde à numeração dos animais.

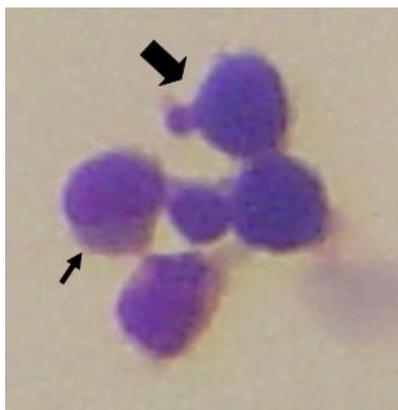


Figura 2 – Eritrócito policromático com micronúcleo (seta larga) e eritrócito policromático normal (seta estreita) - animal exposto por 5 dias a mepivacaína. (Coloração de Giemsa, aumento de 1000x).

Tabela 2 – Mediana e intervalo interquartílico da frequência de micronúcleos em cada grupo avaliado (n=80).

GRUPO	Intervalo	
	Mediana	interquartílico
Lidocaína - 1 dia	1.00 ^a	3.00
Lidocaína - 5 dias	0.50 ^{a,c}	2.00
Mepivacaína - 1 dia	1.00 ^a	1.00
Mepivacaína - 5 dias	1.00 ^a	2.00
Articaína - 1 dia	1.00 ^a	2.00
Articaína - 5 dias	0.00 ^{a,c}	1.00
Prilocaína - 1 dia	0.00 ^{a,c}	1.00
Prilocaína - 5 dias	0.00 ^c	1.00
Controle negativo - 1 dia	1.00 ^{a,c}	2.00
Controle negativo - 5 dias	0.00 ^{a,c}	4.00
Ciclofosfamida [#]	10.00 ^d	3.00

[#]controle positivo. Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0.05$).

Houve diferença entre o número de micronúcleos em relação ao grupo controle positivo (ciclofosfamida) e todos os anestésicos locais estudados (quanto ao tipo e quanto ao tempo de exposição) ($p = 0,0001$) (Tabela 1). Porém, não houve diferença entre o número de micronúcleos em relação ao grupo controle negativo e os anestésicos locais estudados (nem quanto ao tipo nem quanto ao tempo de exposição) ($p > 0,05$).

Pelo teste de comparações múltiplas, todos os grupos são iguais, com exceção do grupo da ciclofosfamida, embora tenha sido observada diferença significativa entre a frequência de micronúcleos do grupo exposto a Prilocaína por 5 dias com os grupos expostos a Lidocaína por 1 dia ($p=0.0466$), a Mepivacaína por 1 dia ($p=0.0437$) e por 5 dias ($p=0.0460$) e a Articaína por 1 dia ($p=0.0364$) (Tabela 1).

Discussão

Várias técnicas podem ser utilizadas para testes de genotoxicidade, tais como: coeficiente DNA/proteína, atividade de enzimas mitocondriais, proliferação celular, quebras e reparo de DNA, índices mitóticos, identificação de danos, aberrações cromossômicas e não disjunções e detecção de apoptose e necrose.⁸ O teste de micronúcleo tem sido usado extensivamente em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois os micronúcleos são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas.⁶

O termo “teste de micronúcleo” foi sugerido pela primeira vez em 1970 por Boller e Schmid e posteriormente por Heddle em 1977.¹¹ O micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular por cromossomos ou seus fragmentos que se atrasam em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas ou ainda, falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase.¹²

O teste de micronúcleo possui como vantagens a análise mais simples quando comparadas a outros testes, serve para diagnóstico de doenças e monitoramento ambiental, alta sensibilidade e precisão, detecção de perdas cromossômicas e de não disjunções, medidas de extensão e progressão da divisão nuclear e detecção de eventos de reparo por excisão.⁸ Este estudo escolheu-se este teste para avaliação da genotoxicidade do uso repetido dos anestésicos locais.

Devido às propriedades vasodilatadoras da maioria dos sais anestésicos, quando estes últimos são utilizados isoladamente, nem sempre a duração da anestesia é adequada, tornando necessária a adição de um vasoconstritor. Atualmente, sabe-se que quase nenhuma solução anestésica

teria efeito sem o emprego dos vasoconstritores que dentre algumas vantagens destacam-se: absorção lenta do sal anestésico (que reduz a toxicidade deste e aumenta a duração da anestesia), e possibilita menores quantidades da solução e aumenta o efeito anestésico.² Os mais utilizados em associação com os anestésicos locais pertencem ao grupo das aminas simpatomiméticas, incluindo a adrenalina, a noradrenalina, a levonordefrina, a fenilefrina e a felipressina.¹³

Algumas desvantagens dos vasoconstritores são decorrentes de uso como: injeções intravasculares, concentrações elevadas, aplicações rápidas e grandes volumes levando a intoxicação.¹² Assim, em alguns pacientes faz-se necessário a não utilização de vasoconstritores (pacientes diabéticos, cardiopatas, gestantes). Neste caso, o sal anestésico mais utilizado é a mepivacaína sem vasoconstritor¹², por isso neste estudo, somente esta droga foi empregada sem associação deste. Na literatura, não há trabalhos que avaliaram a ação genotóxica dos vasoconstritores.

A literatura mostra que a prilocaína exhibe a atividade genotóxica em células somáticas, sendo capaz de induzir a recombinação homóloga. No entanto, a lidocaína e a articaína (Septanest[®]) parecem ser incapazes de induzir efeitos relacionados com a genética cromossômica, mutação ou recombinação.¹⁴ No presente estudo, não foi observada ação genotóxica associada ao uso de nenhum destes três anestésicos locais, concordando parcialmente com os dados de literatura, que mostra ação genotóxica da prilocaína.¹⁴

Foi demonstrado o aumento das porcentagens de células com poliploidia ou endorreducação na exposição ao cloridrato de prilocaína e cloridrato de procaína na ausência ou presença de ativação metabólica exógena.¹⁵ Estes resultados indicam que estes agentes químicos que tiveram uma resposta positiva são potencialmente genotóxicos para células de mamíferos.¹⁵ Porém, neste estudo não foi observada ação genotóxica da prilocaína, possivelmente por ter sido utilizada a dose preconizada por quilo de peso.

Foi observada condensação nuclear e fragmentação da cromatina presentes em células tratadas com prilocaína.¹⁶ A formação de fragmentos de DNA também foi induzida pelo tratamento com prilocaína.¹⁶ A prilocaína induz a formação de fragmentos de DNA dependente da dose, com efeito máximo na

concentração de 5 mM e foi dependente do tempo de 12-48 horas.¹⁶ Estes dados associados aos achados do presente estudo mostram que o uso de prilocaína na dose preconizada por quilo de peso pode não causar dano genético.

A lidocaína e a prilocaína são principalmente metabolizadas no fígado e após a hidrólise por ésteres de amida, estas liberam as aminas aromáticas monocíclicas, 2,6-dimetilalanina (DMA) e 2-metilalanina (MA), respectivamente.⁵ Outros anestésicos que também contêm a fração de DMA são bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína.⁵

O principal mecanismo de carcinogenicidade de aminas aromáticas, tais como, DMA e MA, acontece por metabolização do citocromo P450, para os derivados de N-hidroxila.⁵ O DMA e o MA podem ser posteriormente metabolizados por conjugação a metabolitos reativos. A lesão de DNA por DMA tem sido descrita, mas não por MA. A formação de adutos de DNA é reconhecida como um possível mecanismo pelo qual estes compostos exercem alguns de seus efeitos cancerígenos.¹⁷ Porém, a Agência Nacional de Pesquisa para o Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) não evidenciou carcinogenicidade do DMA para seres humanos, embora haja evidências suficientes de sua carcinogenicidade em ratos.⁵ Isto pode justificar o maior número de micronúcleos observados no grupo da lidocaína (independente do tempo de exposição) em relação ao grupo exposto a prilocaína e a diferença estatística entre o grupo exposto a lidocaína por 1 dia e aquele exposto a prilocaína por 5 dias ($p=0.0466$). Assim, embora a frequência de micronúcleos do grupo exposto a lidocaína não apresente diferença significativa com o grupo controle negativo, o fato do grupo deste anestésico apresentar maior frequência de micronúcleos que a do grupo exposto a prilocaína pode estar associado ao efeito do DMA, produto metabólico da lidocaína.

Não foram encontrados estudos na literatura (base de dados pubmed) que avaliaram o possível efeito genotóxico ou mutagênico da mepivacaína. Neste estudo, a mepivacaína não apresentou efeito genotóxico, independente do tempo de exposição. Entretanto, a exposição a mepivacaína por 1 e 5 dias mostrou diferença estatística com o grupo exposto a prilocaína por 5 dias ($p<0.05$). A mepivacaína também contém a fração de DMA,⁵ o que pode

explicar o maior número de micronúcleos observados no grupo da mepivacaína, embora a frequência de micronúcleos neste grupo não apresente diferença significativa com o grupo controle negativo.

Estudos de mutagenicidade *in vitro* e *in vivo*, não revelaram potencial genotóxico até a dose máxima tolerada para articaína (CAS 23964-58-1) e sua respectiva preparação (Septanest SP; 4% articaína HCl e epinefrina 1:100,000)¹⁸, concordando com os dados do presente estudo, que não observou efeito genotóxico no estudo *in vivo*, utilizando-se a dose preconizada por quilo de peso. Embora, a articaína seja do grupo amida dos anestésicos locais, como a lidocaína, a prilocaína e a mepivacaína, ela é metabolizada no soro por colinesterases plasmáticas via hidrólise em ácido artínico, um metabólito inativo, o qual é parcialmente metabolizado no rim em ácido glucoronídico artínico e não em aminas aromáticas, as quais são potencialmente genotóxicas, como os outros anestésicos citados.¹⁹ Este dado pode justificar, em parte, a ausência de ação genotóxica da articaína. Porém, a exposição a articaína por 1 dia mostrou diferença estatística com o grupo exposto a prilocaína por 5 dias ($p=0.0364$). Isto pode ter ocorrido devido à presença de um “outlier” (mais do que o esperado) no primeiro grupo, que esteve muito acima da frequência geral de micronúcleos.

No presente estudo, não foi observado aumento da frequência de micronúcleos em relação a nenhum dos anestésicos locais estudados (lidocaína, mepivacaína, articaína e prilocaína), usados na dose preconizada por quilo de peso, nem com relação à exposição única nem com relação à exposição repetida. Entretanto, outros testes que avaliem genotoxicidade e mutagenicidade devem ser aplicados para que se possa descartar de forma definitiva que o uso repetido destes anestésicos não apresentam atividade genotóxica nem mutagênica.

Referências

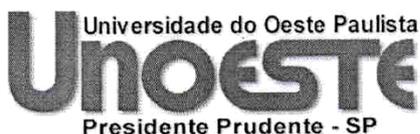
1. Moore PA, Hersh EV. Local anesthetics: pharmacology and toxicity. *Dent Clin North Am.* 2010; **54**:587-99.
2. Mariano RC, Santana SI, Coura GS. Análise comparativa do efeito anestésico da lidocaína 2% e da prilocaína 3%. *Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia – BCI.* 2000; **7**:15-19.

3. Jastak JT, Yagiela JA. Vasoconstrictors and local anesthesia: a review and rationale for use. *JADA*. 1983; **107**:623 – 630.
4. Smith M T. The Mechanism of Benzene-induced Leukemia: A Hypothesis and Speculations on the Causes of Leukemia. *Environ Health Perspect*. 1996; **104**:1219-1225.
5. Duan JD, Jeffrey AM, Williams GM. Assessment of the medicines Lidocaine, Prilocaine, and their metabolites, 2,6-Dimethylaniline and 2-methylaniline, for DNA adduct formation in rat tissues. *Drug metabolism and disposition journal*. 2008; **8**:1470-1475.
6. Flores M, Yamaguchi UM. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. *Journal of health research*. 2008; **1**:337-340.
7. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUman MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*. 1999; **428**:271–83.
8. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res*. 1987; **189**:103-12.
9. Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. Curso de manipulação de animais de laboratório. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005.
10. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992; **271**:69-77.
11. Evans HJ. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat Res*. 1997; **392**:5-10.
12. Ramírez A, Saldanha PH. Análise crítica de grupos controle no teste de micronúcleo na mucosa bucal. *Genet Mol Biol* 1998; 21(3): 140.
13. Perusse R, Goulet JP, Turcotte, JY. Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part I. *Oral Surg Oral med Oral Pathol*, 1992; **74**:679-686.
14. Schneider LE, do Amaral VS, Dihl RR, Lehmann M, Reguly ML, de Andrade HH. Assessment of genotoxicity of Lidocaine, Prilonest and Septanest in the drosophila Wing-Spot test. *Food Chem Toxicol*. 2009; **47**(1):205-8.
15. Hagiwara M, Watanabe E, Barrett JC, Tsutsui T. Assessment of

- genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res.* 2006; **603**:111-20.
16. Nakamura K, Kido H, Morimoto Y, Morimoto H, Kobayashi S, Morikawa M, Haniji T. Prilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. *Can J Anaesth.* 1999; **46**:476-82.
17. Preston RJ, Williams GM. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard. *Crit Rev Toxicol.* 2005; **35**: 673-683.
18. Leuschner J, Leblanc D. Studies on the toxicological profile of the local anaesthetic articaine. *Arzneimittelforschung.* 1999; **49**:126-32.
19. Snoeck M. Articaine: a review of its use for local and regional anesthesia. *Local Reg Anesth.* 2012; **5**:23–33.

ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).



Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO NO USO REPETIDO DE ANESTÉSICOS LOCAIS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**” cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número nº 930/11 (online) tendo como pesquisador responsável a Profa. Dra. **GISELE ALBORGHETTI NAI**, a técnica **MARIANA FONSECA PEREZ SILVA** e as acadêmicas **GRAZIELA DE OLIVEIRA TAVARES**, **LAÍS FABRÍCIO FONSECA PEREIRA**, **MARILIZA CASANOVA DE OLIVEIRA**, **NÁDIA DERLÍ SALVADOR LEMES SOARES**, **PATRICIA GATTI SILVA**, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP, em reunião realizada em 17/11/2011.

Presidente Prudente, 21 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE

Anexo 2 – Normas de publicação da revista científica a qual o artigo será submetido.

European Journal of Anaesthesiology

Guidance for Authors on the Preparation and Submission of Manuscripts to the European Journal of Anaesthesiology

Note: These instructions comply with those formulated by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). For further details, authors should consult the following article: International Committee of Medical Journal Editors. "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" *New Engl J Med* 1997, **336**:309–315. The complete document appears at <http://www.icmje.org>.

Scope

The *European Journal of Anaesthesiology* (EJA) publishes original work of high scientific quality in the field of anaesthesiology, pain, emergency medicine and intensive care. Preference is given to experimental work or clinical observation in man, and to laboratory work of clinical relevance. The journal also publishes commissioned reviews by an authority, abstracts of scientific meetings, editorials, commentaries, special articles and correspondence are also included.

Redundant or duplicate publication

We ask you to confirm that your paper has not been published in its current form or a substantially similar form (in print or electronically, including on a web site), that it has not been accepted for publication elsewhere, and that it is not under consideration by another publication. The ICMJE has provided details of what is and what is not [duplicate or redundant publication](#). If you are in doubt (particularly in the case of material that you have posted on a web site), we ask you to proceed with your submission but to include a copy of the relevant previously published work or work under consideration by other journals. Authors must draw attention to any published work that concerns the same patients or subjects as the present paper in a covering letter with their article.

Conflicts of interest

Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript (see paragraph: Acknowledgements).

Permissions to reproduce previously published material

The EJA requires you to send us copies of permission to reproduce material (such as illustrations) from the copyright holder. Articles cannot be published without these permissions.

Patient consent forms

The protection of a patient's right to privacy is essential. Please collect and keep copies of patients' consent forms on which patients or other subjects of your experiments clearly grant permission for the publication of photographs or other material that might identify them. If the consent form for your research did not specifically include this, please obtain it or remove the identifying material.

A statement to the effect that such consent had been obtained must be included in the 'Methods' section of your paper. If necessary the Editors may request a copy of any consent forms.

Ethics committee approval

All articles dealing with original human or animal data must include a statement on ethics approval at the beginning of the Methods section. This paragraph must contain the following information: the name and address of the ethics committee responsible; the protocol number that was attributed by this ethics committee; the name of the Chairperson of the ethics committee (or the person who approved the protocol) and the date of approval by the ethics committee.

The paragraph could read, for example:

Ethics: Ethical approval for this study (Ethical Committee N° NAC 207) was provided by the Ethical Committee NAC of Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland (Chairperson Prof N. Dupont) on 12 February 2007.

In addition and as stated above, for studies conducted on human participants you must state clearly that you obtained written informed consent from the study participants; please also look at the latest version of the [Declaration of Helsinki](#). Similarly, for experiments involving animals you must state the care of animal and licensing guidelines under which the study was performed and report these in accordance with the ARRIVE (Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments) statement. If ethics clearance was not necessary, or if there was any deviation from these standard ethical requests, please state why it was not required. Please note that the editors may ask you to provide evidence of ethical approval. If you have approval from a National Drug Agency (or similar) please state this and provide details, this can be particularly useful when discussing the use of unlicensed drugs.

Adherence to international guidelines on adequate data reporting

The European Journal of Anaesthesiology adheres to the guidelines on adequate data reporting that were established by The Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research (EQUATOR) network (<http://www.equator-network.org/home/>). For more information, see the EJA Editorial: [Guidelines on adequate data reporting: use them!](#)

Authorship

We ask all authors to confirm that they have read and approved the paper. Second, we ask all authors to confirm that they have met the criteria for [authorship](#) as established by the ICMJE, believe that the paper represents honest work, and are able to verify the validity of the results reported.

All persons designated as authors should qualify for authorship and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. One or more authors should take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article. Authorship credit should be based only on 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published. Conditions 1, 2 and 3 must all be met. Acquisition of funding, the collection of data or general supervision of the research group, by themselves, do not justify authorship. All others who contributed to the work who are not authors should be named in the Acknowledgements section.

Retractions

The EJA is a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)), and also refers to the ICMJE advice on [Corrections, Retractions and "Expressions of Concern"](#) as well as on [Overlapping Publications](#).

Compliance with Research Funding Agency Accessibility Requirements

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the "post-print" (the final manuscript, in Word format, after peer-review and acceptance for publication but prior to the publisher's copyediting, design, formatting, and other services) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, or the Howard Hughes Medical Institute to PubMed Central. Authors of research funded by other funding agencies may submit the post-print 12 months after publication of the final article, or 6 months after publication if the funding agency mandates a shorter time-frame.

Copyright assignment

Papers are accepted for publication on the understanding that exclusive copyright in the paper is assigned to the Publisher. Each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the ICMJE. The form is readily available on the manuscript submission page and can be completed and submitted electronically. Please note that authors may sign the copyright transfer agreement form electronically. For additional information about electronically signing this form, go to <http://links.lww.com/ZUAT/A106>. Without the signed copyright form, the manuscript cannot be published.

Submissions

All manuscripts and materials must be submitted through the web-based tracking system at <https://www.editorialmanager.com/eja/>. Submissions should be in English, UK spelling is preferred. The site contains instructions and advice on how to use the system. Authors should NOT in addition then post a hard copy submission to the editorial office, unless you are supplying artwork, letters or files that cannot be submitted electronically, or have been instructed to do so

by the editorial office. For those authors who have no option but to submit by mail please send one copy of the article, plus an electronic version on disk or CD-ROM to the following address: **European Journal of Anaesthesiology**, Editorial Office, Lippincott, Williams & Wilkins, 250 Waterloo Road, London, SE1 8RD, UK.

1.5 spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate page: Title Page, Abstract and Keywords, Text, Acknowledgements, References, Tables and Figures, and captions. Margins should be not less than 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the Title Page, and the page number should be placed in the top right hand corner of each page. Two letter abbreviations should be avoided. Longer abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided.

Article Types

Randomised Controlled Trials

Authors are requested to report these in accordance with the CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) statement [www.consort-statement.org]. This ensures that enough information is provided for editors, peer reviewers, and readers to see how the study was performed and to judge whether the findings are likely to be reliable (see EJA Editorial: [Adherence to guidelines for improved quality of data reporting: where are we today?](#)). Please provide the following:

- A [flow chart](#) showing the progress of participants through the study. The example flowchart may be adapted as required.
- A [checklist](#) for editors and reviewers (not for publication) showing that you have described the recommended respective key points in your report.

Maximum length of reports of randomised controlled trials is 3500 words. Please provide a structured abstract (max. 400 words, see subheading Structured Abstract).

Observational Study (Cohort, Case-control, Cross-sectional, Case Series)

Authors are requested to report these in accordance with the STROBE (STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology) statement [www.strobe-statement.org].

Maximum length of reports of observational studies is 3500 words. Please provide a structured abstract (max. 400 words, see subheading Structured Abstract).

Studies of Diagnostic Accuracy

Authors are requested to report these in accordance with STARD (STandard for the Reporting of Diagnostic accuracy) statement [www.stard-statement.org].

Maximum length of reports of Diagnostic studies is 3500 words. Please provide a structured abstract (max. 400 words, see subheading Structured Abstract).

Systematic Reviews (with or without meta-analysis)

Authors are requested to submit these as 'Original articles' (not 'Reviews') and report them in accordance with the PRISMA (Transparent Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analyses) Statement [www.prisma-statement.org]. This ensures that enough information is provided for editors, peer reviewers, and readers to see how the study was performed and to judge whether the findings are likely to be reliable (see EJA Editorial: [Adherence to guidelines for improved quality of data reporting: where are we today?](#)). Please provide the following:

- A [flow chart](#) showing the progress of retrieved reports through the review
- A [checklist](#) for editors and reviewers (not for publication) showing that you have described the recommended respective key points in your report.

Maximum length of reports of systematic reviews is 3500 words. Please provide a structured abstract (max. 400 Words, see subheading Structured Abstract). Authors are encouraged to publish additional material (for instance, large tables, figures with forest plots, data from subgroup analyses etc.) as Supplemental Digital Content (see above for details).

Conventional, Non-systematic Reviews

These are usually commissioned. Maximum length of reviews is 3500 words. Please provide an unstructured abstract (max. 250 words). Please include a title page giving the author's name, address, email address, phone and fax numbers, as well as an Acknowledgement statement (see paragraph: Acknowledgements) and signed copyright forms.

Practice Guidelines

In general, published statements intended to guide clinical care (e.g., Guidelines, Practice Parameters, Recommendations, Consensus Statements, Position Papers) should describe:

1. The clinical problem to be addressed;
2. The mechanism by which the statement was generated;
3. A review of the evidence for the statement (if available), and;
4. The statement on practice itself.

As more than one group or society may issue statements on the same topic, this often results in confusion amongst clinicians. To minimize confusion and to enhance transparency, such statements should begin with the following bulleted phrases, followed by brief comments addressing each phrase:

- What other guideline statements are available on this topic?
- Why was this guideline developed?

- How does this statement differ from existing guidelines?
- Why does this statement differ from existing guidelines?

Editorials

Editorials discuss issues that are not directly related to published material. Editorials are usually commissioned. Editorials should be up to 1500 words long with no more than 15 references. Please include a title page giving all authors' names, addresses, email addresses, phone and fax numbers, as well as an Acknowledgement statement (see paragraph: Acknowledgements) and signed copyright forms. Editorials do not have an abstract.

Commentaries

Commentaries discuss issues that are directly related to published material. Commentaries accompany original articles, critically appraise their results and put their conclusions into a wider context. Commentaries are always commissioned and should be up to 1000 words long with no more than 10 references. Commentaries do not have an abstract. Please include a title page giving the author's name, address, email address, phone and fax numbers, as well as an Acknowledgement statement (see paragraph: Acknowledgements) and signed copyright forms.

Correspondence

In this section, we publish case reports, letters and replies. Items in the Correspondence section are peer reviewed. Please look at a very recent copy of the European Journal of Anaesthesiology to see how the material should be presented. The format (layout) for the Correspondence section is quite different from our other articles. The absolute maximum is 1000 words, which must include the space for any tables and illustrations (this is approximately two sides of printed matter in the Journal). References are limited to seven. Correspondence articles do not have an abstract. Please include a title page giving the author's name, address, email address, phone and fax numbers, as well as an Acknowledgement statement (see paragraph: Acknowledgements) and signed copyright forms.

Case Reports

Case reports should follow the guidance for correspondence (see above). In addition case reports dealing with patients must state that informed consent to publication was obtained from the patient or guardian (or was granted by a competent ethics committee).

Presentation of papers

Title Page

The Title Page should carry the full title of the paper and a short title to be used as a 'running head' (and which should be so identified). Please, include the study design in the title; for instance, "randomized trial", or "systematic review". Titles should be as informative and complete as possible. The EJA Editorial: [How to write a good title](#) provides some help. The first name, middle initial and last name of each author and their affiliations should appear. Academic degrees should not be stated. If the work is to be attributed to a department or institution, its full name should be included. The name and address of the corresponding author and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made should also appear on the Title Page.

Structured Abstract

For original articles, the second page should carry an abstract, which will be printed at the beginning of the paper and should not be more than 400 words. Use the following headings and information as appropriate (which are adapted from the [BMJ](#) and [JAMA](#) websites). The abstract should be usable as it stands by abstracting journals. Because of this it should contain some numerical data (if appropriate), not just statistical statements, and it should not contain abbreviations or references (see EJA Editorial: [Writing the abstract: completeness and accuracy matter](#)).

Example: Randomised controlled trial, observational study, diagnostic study, animal study

Context: Explaining the clinical (or other) importance of the study question.

Objective(s): Including a clear statement of the main aim(s) of the study and the major hypothesis tested or research question posed. Avoid statements such as "We aimed to evaluate the effectiveness of X".

Design: For example, randomised-controlled study, case control study, crossover study, observational study, survey, diagnostic test etc.

Setting: Include the level of care e.g. primary, secondary; number of participating centres. Be general rather than give the name of the specific centre, but give the geographical location if this is important. Include the dates of the study period.

Patients, other participants (delete what does not apply): Numbers entering and completing the study, sex, and ethnic group if appropriate. Give clear definitions of how selected, entry and exclusion criteria. For animal studies, this information should be included in the Design or Setting section.

Intervention(s): What, how, when and for how long. This heading can be deleted if there were no interventions but should normally be included for randomised controlled trials, cross over trials, and before and after studies.

Main outcome measures: What was the primary endpoint? What outcome measures were planned in protocol, which were finally measured (if different, explain why)?

Results: Main results with (for quantitative studies) 95% confidence intervals and, where appropriate, the exact level of statistical significance.

Conclusions: Primary conclusions and their implications, suggest areas for further research if appropriate.

Trial registration: If appropriate, the trial registration should be stated at the end of the abstract, for example: "Trial registration: Clinicaltrials.gov identifier: NCT00405977."

Example: Systematic reviews with or without meta-analyses

Context:

Objective(s):

Design: For example: Systematic review of randomised controlled trials with meta-analyses.

Data sources: Where included studies were retrieved from? Include years searched.

Eligibility criteria: Describe inclusion and non-inclusion criteria of selected studies.

Results:

Conclusions:

Key Words

The abstract should be followed by a list of 3–10 key words or short phrases which will assist the cross-indexing of the article. When possible, the terms used should be from the Medical Subject Headings list of the National Library of Medicine.

Text

The remainder of the text should be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results, and Discussion (including a conclusion).

Acknowledgements

The acknowledgements section should contain three distinct statements in three separate paragraphs:

1. Assistance with the article. Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions. If there was no assistance state: none declared.
2. Financial support and sponsorship. You must make reference to all relevant sources of funding concerning this article. If there were no sources of funding please state: none declared.
3. Conflicts of interest. You must make reference to all relevant conflicts of interest concerning this article. If there are no conflicts of interest please state: none declared.

For example:

Acknowledgements

Assistance with the study: We would like to thank Dr John A. Smith for his assistance with the study.

Financial support and sponsorship: This work was supported by the Department of Anaesthesiology, London Hospital, London, UK.

Conflicts of interest: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organisation Y, and C is on the speaker's bureau for Organisation X. For the remaining authors none were declared.

References

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in the text, tables and legends using superscripted Arabic numerals that are placed after the punctuation.

References cited only in tables or in legends to figures should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustration.

Use the Vancouver reference system as adopted by the U.S. [National Library of Medicine](#) ensuring that all journal titles conform to Index Medicus approved abbreviations. If in doubt, look up the reference list of a recent paper published in the *European Journal of Anaesthesiology*.

Avoid citing abstracts unless from a MEDLINE or EMBASE indexed journal.

Unpublished observations and personal communications should not be used as references, although references to written (not verbal) communications may be inserted (in parentheses) in the text. Manuscripts that have been accepted but not yet published (e.g. Epub ahead of print) should be included in the list, followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted may be

cited only in the text as (unpublished observations). Authors should verify references against the original documents before submitting the article. Electronic or online references should be cited in the reference list only if the material referenced is a specific article (e.g. a paper published in a web-based journal); see below for correct style. Less specific references (e.g. the web pages of societies, organisations and university departments) should not appear in the references; instead the URL should be cited in full in the text. Authors must confirm that the details of these references are accurate and complete. In the full list of references give the names and initials of all authors. If there are more than six, cite only the first three names followed by et al. The authors' names are followed by the title of the article: the title of the journal (*italics*) abbreviated according to the style of Index Medicus: the year of publication: the volume number (in bold): the first and last page numbers in full followed by a full stop. Titles of books should be followed by the town and country of publication, the publisher, the year and inclusive page numbers. See the following examples:

Journal articles

Pollard BJ, Bryan A, Bennett D et al. Recovery after oral surgery with halothane, enflurane, isoflurane or propofol anaesthesia. *Br J Anaesth* 1994; **72**: 559–566.

Books

Korttila K. Recovery period and discharge. In: White P, ed. *Outpatient Anaesthesia*. New York, USA: Churchill Livingstone Inc, 1990: 369–395.

Chapter in a book:

Pessayre D, Feldmann G, Haouzi D, Fau D, Moreau A, Neumann M. Hepatocyte apoptosis triggered by natural substances (cytokines, other endogenous molecules and foreign toxins). In Cameron RG, Feuer G (editors): *Apoptosis and its Modulation by Drugs. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag; 2000, pp. 59-108.

Electronic articles:

Margolis PA, Stevens R, Bordley WC, Stuart J. From concept to application: the impact of a community-wide intervention to improve the delivery of preventive services to children. *Pediatrics* [online serial] 2001; 108:e42. <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/3/e42>. [Accessed 20 September 2001].

Tables

References to tables should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Table 1). Each table should be typed on a separate sheet in 1.5 spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should have a brief title as a heading. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Authors are discouraged from using abbreviations in tables. If abbreviations are necessary then please explain them in the table's footnotes. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation (SD) and standard error of the mean (SEM).

Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

Authors are encouraged to submit non-essential tables as supplemental digital content for publication online only. See Supplemental Digital Content section for more details.

Figures

A) Creating Digital Artwork

1. Learn about the publication requirements for Digital Artwork:

<http://links.lww.com/ES/A42>

2. Create, Scan and Save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guideline Checklist (below).

3. Upload each figure to Editorial Manager in conjunction with your manuscript text and tables.

B) Digital Artwork Guideline Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital artwork:

- Artwork should be saved as TIFF, EPS, or MS Office (DOC, PPT, XLS) files. High resolution PDF files are also acceptable.
- Crop out any white or black space surrounding the image.
- Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If created in an MS Office program, send the native (DOC, PPT, XLS) file.
- Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.
- Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.
- Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

Remember:

- References to figures should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Fig. 2).
- Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
- Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and enter figure numbers consecutively in the Description field when uploading the files.
- If hard copies are submitted they should have a label pasted to the back bearing the figure number, the title of the paper, the author's name and a mark indicating the top of the figure. Figures should be presented to a width of 82 mm or, when the illustration demands it, to a width of 166 mm.
- Photomicrographs must have internal scale markers. If photographs of people are used, their identities must be obscured or their written consent to use the photograph must have been obtained. If necessary the Editors may request copies of any consent forms.
- If a figure has been published before, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be submitted with the material. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in the public domain.

- Figures may be reduced, cropped or deleted at the discretion of the editor.

Figure legends

Captions should be typed in 1.5 spacing, beginning on a separate page. Each figure should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Figure 3) and a brief title as a heading. Internal scales should be explained and staining methods for photomicrographs should be identified.

Units of measurement

Scientific measurements should be given in SI units. Blood pressure, however, may be expressed in mmHg and haemoglobin as g dL⁻¹.

Abbreviations and symbols

Authors are discouraged from using abbreviations. If an abbreviation is necessary please use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

Supplemental Digital Content

Authors may submit supplemental digital content (SDC) to enhance their article's text and to be considered for online-only posting. SDC may include the following types of content: text documents, graphs, tables, figures, graphics, illustrations, audio, and video. On the Attach Files page of the submission process, please select Supplemental Audio, Video, or Data for your uploaded file as the Submission Item. If an article with SDC is accepted, our production staff will create a URL with the SDC file. The URL will be placed in the call-out within the article. SDC files are not copy-edited by LWW staff, they will be presented digitally as submitted. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

SDC Call-outs

Supplemental Digital Content must be cited consecutively in the text of the submitted manuscript. Citations should include the type of material submitted (Audio, Figure, Table, etc.), be clearly labelled as "Supplemental Digital Content," include the sequential list number, and provide a description of the supplemental content. All descriptive text should be included in the call-out as it will not appear elsewhere in the article.

For example:

We performed many tests on the degrees of flexibility in the elbow (see Video, Supplemental Digital Content 1, which demonstrates elbow flexibility) and found our results inconclusive.

List of Supplemental Digital Content

A listing of Supplemental Digital Content must be submitted at the end of the manuscript file. Include the SDC number and file type of the Supplemental Digital Content. This text will be removed by our production staff and not be published.

For example:

Supplemental Digital Content 1.wmv

SDC File Requirements

All acceptable file types are permissible up to 10 MBs. For audio or video files greater than 10 MBs, authors should first query the journal office for approval. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

Reprints

Reprints may be purchased using the appropriate form that will be made available with proofs. Orders should be sent when the proofs are returned; orders received after this time cannot be fulfilled.

English language editing

If you are inexperienced in publishing medical articles in English then it may be helpful to have your manuscript reviewed by a professional editor so that you submit it in grammatically and syntactically acceptable English. The list below is provided for the benefit of authors seeking assistance in writing and editing their manuscripts. The *EJA* does not endorse any writing/editing services.

American Journal

Experts (<http://www.journalexperts.com/?rcode=LWW1>) Discount Available for LWW Journal Authors)

BioMedES (Biomedical Editorial Services) (<http://www.biomedes.co.uk>)

Biomedical Science Writers, LLC

(<http://www.biomedicalsciencewriters.com/index.htm>)

BoldFace Editors (<http://www.boldfaceeditors.com>)

Cambridge Language Consultants (<http://www.camlang.com/proof.cfm>)

Council of Science Editors Manuscript Services Listing

(<http://www.councilscienceeditors.org>)

Editage (<http://www.editage.com>)

Elizabeth Betsch, ELS , Medical Edits.com (ejb@medicaledits.com)

English Science Editing (<http://www.english-science.com/journals.html>)

English Manager Science Editing (Australia)

(<http://www.sciencemanager.com/>)

ScienceDocs (<http://www.sciencedocs.com>)

SciTechEdit International Science Editing

(<http://www.internationalscienceediting.com/>)

SquirrelScribe (<http://www.squirrelscribe.com>)

Text Check (<http://www.textcheck.com>)

The Medical Editor (<http://www.themedicaleditor.com/>)

Write Science Right (<http://writescienceright.com>)