

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

Cristiano de Cristo Gomes

**Avaliação da Citotoxicidade e da Genotoxicidade de uma Liga Metálica Utilizada em
Implantes Médicos**

São José dos Campos, SP
2008

Cristiano de Cristo Gomes

Avaliação da Citotoxicidade e da Genotoxicidade de uma Liga Metálica Utilizada em Implantes Médicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Orientadores: Prof. Dr. Fábio Vieira dos Santos
Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares**

**São José dos Campos, SP
2008**

G613a

Gomes, Cristiano de Cristo

Avaliação da Citotoxicidade e da Genotoxicidade de uma Liga Metálica Utilizada em Implantes Médicos / Cristiano de Cristo Gomes; Orientadores: Prof. Dr. Fabio Vieira dos Santos, Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares.-- São José dos Campos, 2008.

64 f.; 1 disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. 2008.

1. Citotoxicidade 2. Genotoxicidade 3. Titânio 4. Ligas metálicas I. Santos, Fabio Vieira, Orient. II. Soares, Cristina Pacheco, orient. III. Título

CDU:575.1

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica desde que citada à fonte.



Aluno: Cristiano de Cristo Gomes

Data: São José dos Campos 8 de outubro de 2008.

CRISTIANO DE CRISTO GOMES

“AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA GENOTOXICIDADE DE UMA LIGA METÁLICA UTILIZADA EM IMPLANTES MÉDICOS”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof^ª. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP) *Cristina P. Soares*
Prof. Dr. **FÁBIO VIEIRA DOS SANTOS** (UNIVAP) *Fábio Vieira dos Santos*
Prof^ª. Dra. **JULIANA PEREIRA LYON** (UNIVAP) *Juliana Pereira Lyon*
Prof. Dr. **WALCLÉCIO MORAIS LIRA** (UNIESP) *W. Moraes Lira*

Prof^ª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa
Diretor do IP&D – UniVap
São José dos Campos, 08 de outubro de 2008.

Dedico

Ao meu pai, que infelizmente não está mais comigo e não pôde acompanhar este processo, mas que estaria tão feliz quanto eu neste momento. Não posso mais dar-lhe um abraço e sentir com ele esta emoção, mas posso ainda agradecer aqui o seu carinho, seus bons exemplos e a confiança que sempre depositou em mim.

Pedro Alves Gomes
in memóriam

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível primeiramente com a ajuda de Deus, que em todos os momentos esteve ao meu lado, mostrando que nada somos sem Sua mão de misericórdia e bondade protegendo-nos a todo instante.

Agradeço à minha esposa, Josiane, que desde o primeiro momento desta jornada deu-me um grande apoio com sua compreensão, incentivo constante, amizade e colaboração.

À Professora Dr^a Cristina Pacheco Soares, que me apresentou com seu laboratório o mundo da pesquisa científica. Não posso deixar de agradecer, sobretudo, por sua atenção, paciência, dinamismo, palavras e gestos de amizade.

Ao Professor Dr. Fabio Vieira dos Santos, cuja dedicação seria difícil expressar em palavras, pois vi em mim um ser humano, não apenas seu orientando, estando sempre ao meu lado nos experimentos, pronto para dar-me incentivo.

Ao Professor Dr. Alfeu que, com sua palestra, despertou-me o interesse por este projeto e por sua constante colaboração nos biomateriais.

Aos Professores Dr. Newton Soares da Silva, Dr. Marco Antonio e Professora Dr^a Josane por estarem à disposição quando precisei de ajuda.

Ao Prof. Dr. Gilbert, pela paciência no preparo e decapagem dos biomateriais.

Ao Marcio, pela estadia em São José dos Campos, por estar sempre animado, alegre e pronto para ajudar.

Ao Dr. Erick e ao Mota, pela colaboração.

Aos amigos do laboratório — Alexandre, Maíra, Karina, Fernanda, Aline, Davi, Milena, Renata, Juliana, Juliana Guerra, Ricardo, Patrícia, Marta e Allison por sempre me ajudarem.

À dona Ivone e à Valéria, que me ajudaram muitíssimo e felizmente, hoje, posso fazer este agradecimento especial.

À bibliotecária Rúbia, que não me ajudou somente com os artigos e ISOs, mas também com palavras de incentivo.

À minha família, que é enorme e especialmente a minha mãe Iracema. Como não posso agradecer aqui, citando o nome de cada um, gostaria de expressar meu sincero agradecimento a todos, mas somente o amor de Deus pode recompensá-los por seu apoio.

À supervisora Margarete Cordioli, pelo acompanhamento e dedicação em todos os processos da Bolsa Mestrado.

A todos os diretores e responsáveis pela Bolsa Mestrado, que neste período de dedicação a este curso dispensaram-me toda atenção e compreensão. Esse apoio foi, sem dúvida, fundamental em mais esta conquista na minha vida.

À Secretaria de Educação, que por meio do projeto Bolsa Mestrado pôde me propiciar mais esta realização não só profissional, mas também pessoal.

À Universidade do Vale do Paraíba, que através do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, sob direção do Prof. Dr. Marcos Tadeu, Tavares Pacheco propiciaram todas as condições necessárias para que este trabalho fosse realizado.

Hoje, fico emocionado ao recordar das pessoas que, cada qual à sua maneira, contribuíram para a finalização desta etapa em minha vida. É compreensível que eu não seja capaz de escrever o nome de cada uma aqui, mas desejo sinceramente que Deus retribua a elas a compreensão que me deram, bem como o simples, mas grandioso gesto de carinho. Muitas vezes pude perceber como a vida é feita de pequenas ações.

Avaliação da Citotoxicidade e da Genotoxicidade de uma Liga Metálica Utilizada em Implantes Médicos

RESUMO

O uso de implantes metálicos, empregados na medicina para o restabelecimento de funções perdidas por uma região do corpo em função de doenças, desgaste ou como resultado de acidentes, tem se tornado uma prática cada vez mais comum. Atualmente, o meio científico vem demonstrando grande preocupação no reconhecimento de biomateriais, utilizados na confecção desses implantes, cuja composição química possa representar um risco à saúde do paciente, seja de forma aguda ou após longos períodos de utilização. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a citocompatibilidade de um extrato obtido da liga Ti-6Al-4V por meio de testes de citotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*, empregando os testes do MTT e do micronúcleo com bloqueio de citocinese, respectivamente. Foi verificada também a interferência desse extrato sobre o processo de mitose, avaliando-se o Índice de Binucleação. Para a realização do teste do MTT, células da linhagem CHO-K1 foram incubadas com diferentes concentrações do extrato da liga (100% 75% 50% e 25%) a 37°C, por 24 e 48 horas. A mesma linhagem celular foi utilizada para avaliação da mutagenicidade e do índice de binucleação, porém, nesses casos, foram avaliadas apenas as doses de 50%, 75% e 100% do extrato, após 2 horas de exposição. Após a análise estatística, realizada utilizando-se o software INSTAT, não foi verificada qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle negativo nos resultados obtidos através do teste do MTT. Já para o Teste do Micronúcleo foi observada um aumento significativo na frequência de células micronucleadas em todas as concentrações avaliadas, demonstrando que íons metálicos provavelmente liberados a partir da liga Ti-6Al-4V foram capazes de induzir quebras e/ou perda de cromossomos inteiros. A influência do extrato da liga metálica no ciclo celular e no processo de mitose foi demonstrada para as duas maiores concentrações avaliadas (75% e 100%). Nesses casos o índice de binucleação foi reduzido em relação ao grupo controle negativo, demonstrando uma redução do número de células que entraram em divisão após os tratamentos. A partir desses resultados, podemos concluir que o extrato da liga metálica foi capaz de induzir alterações genéticas e que, provavelmente em função desses danos, ocorreram alterações no índice mitótico. Esses resultados sugerem que análises mais detalhadas sejam realizadas quanto a avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais.

Palavras-Chave: Citotoxicidade, genotoxicidade, índice mitótico, liga Ti-6Al-4V

Evaluation of the Citotoxicity and Genotoxicity of a metallic alloy used in Medical Implants

ABSTRACT

The use of metal implants employed in medicine for the recovering of lost functions by parts of the body due to illnesses, wear or as a result of accidents has become a common practice. Nowadays, researchers have shown great concern in recognizing biomaterials that are used in the manufacturing of those implants, whose chemical composition may represent a risk to a patient's health, either in an acute form or after long periods of utilization. In this context, the aim of this work was to evaluate the cytocompatibility of an extract taken from the metallic alloy Ti-6Al-4V through citotoxicity and mutagenicity tests *in vitro* using MTT assay and the cytokinesis-block micronucleus assay respectively. The interference of that extract was also verified over the mitosis process with the evaluation of the Binucleation Index. In order to the MTT test, CHO-K1 cells were incubated with different concentrations of the alloy (100% 75% 50% and 25%) at 37°C for 24 and 48 hours. The same cell strain was used for the evaluation of mutagenicity and binucleation index; however, in these cases, only the doses of 50%, 75% e 100% of the extract were evaluated after 2 hours of exposure. After statistical analysis, done by using the INSTAT software, no significant statistical difference was observed among the treated groups and the negative control group in the results obtained by the MTT test. However, in the Micronucleus Assay a great increase in the frequency of micronucleated cells was verified in all the concentrations evaluated, showing that the metal ions likely released from the Ti-6Al-4V alloy were able to induce break or loss of whole chromosomes. The influence of the metallic alloy extract in the cell cycle and in the mitosis process was displayed in the two greater concentrations evaluated (75% and 100%). In these cases, the binucleation index was reduced in relation to the negative control group, showing a reduction in the number of cells which entered into division after the treatments. From these results, we can conclude that the alloy Ti-6Al-4V extract was able to induce genetic changes and that probably due to those damages, there were changes in the mitotic index. These results suggest that more detailed analysis must still be conducted with regards to biocompatibility of biomaterials.

Key-words: citotoxicity, genotoxicity, mitotic index, Ti-6Al-4V alloy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Diagrama mostrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro; (b) a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico.....	24
Figura 2: Célula CHO-K1 binucleada com micronúcleo (1000x).....	25
Figura 3: Células CHO-K1 binucleadas marcadas com anticorpos anti-cinetócoro (pontos amarelos). (a) Células binucleadas e um micronúcleo cinetócoro-negativo é indicado. (b) Um micronúcleo cinetócoro-positivo é mostrado.	26
Figura 4: Células CHO-K1 binucleadas típicas (setas brancas) e micronúcleos (seta vermelha).....	26
Figura 5: Peças da Liga Ti-6Al-4V	28
Figura 6: Frascos sob agitação e temperatura controladas para obtenção do extrato da liga Ti-6Al-4V	29
Figura 7: Resumo Esquemático do Protocolo empregado para o Teste de MTT de 24h.	33
Figura 8: Resumo Esquemático do Protocolo empregado para o Teste de MTT de 48h.	34
Figura 9: Esquema de montagem das placas para o Teste de MTT.	34
Figura 10: Resumo Esquemático do Protocolo empregado para o Teste do Micronúcleo	36
Figura 11: As setas indicam exemplos de Células CHO-K1 binucleadas (400x).	37
Figura 12: Índice de viabilidade celular obtido através do teste do MTT em culturas de células CHO-K1, 24 horas após o tratamento com diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V. Para o grupo controle, a viabilidade celular é assumida como de 100%.....	39
Figura 13: Índice de viabilidade celular obtido através do Teste do MTT em culturas de células CHO-K1, 48 horas após o tratamento com diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V. Para o grupo controle, a viabilidade celular é assumida como de 100%.	40
Figura 14: Frequência média de células Binucleadas e Micronucleadas (BNMN) em 1000 células analisadas por grupo de tratamento.	41
Figura 15: Frequência média de células binucleadas em 500 células CHO-K1 analisadas após tratamento com diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V.	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Cronologia da utilização de implantes metálicos.....	17
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência de células binucleadas e micronucleadas em cada experimento, médias e desvios-padrão, após tratamentos com diferentes concentrações do extrato obtido da liga Ti-6Al-4V em culturas de CHO-K1.....	40
Tabela 2: Frequência de células binucleadas em 500 células analisadas após tratamento com diferentes concentrações da liga Ti-6Al-4V.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASTM – Sociedade Americana para Teste de Materiais (American Society for Testing Materials)

a.C. – antes de Cristo

Ti – Titânio

Al – Alumínio

V – Vanádio

Zr – Zircônio

Nb – Nióbio

Ta – Tântalo

Ni - Níquel

Co - Cobalto

Cr - Cromo

C - Carbono

Cl - Cloro

O₂ – Oxigênio

Mo – Molibdênio

•OH – Radical hidroxil

RPM - Rotação por Minuto

SFB - Soro Fetal Bovino

DMSO - Dimetilsulfóxido

µg - Micrograma

MN - Micronúcleo

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

SCE – Troca entre Cromátides irmãs

UF – Ultra Fino

AC – Aberrações Cromossômicas

FISH - Hibridização in situ por Fluorescência

Ti-*pc* – Titânio Comercialmente Puro

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia

DNA - Ácido desoxirribonucleico

cm² – Centímetros Quadrado

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Biomateriais.....	16
2.2 Titânio e outras ligas metálicas como biomateriais	18
2.3 Princípios de Mutagênese	20
2.4 Sistema de cultura de células de mamíferos in vitro.....	21
2.4 Teste do Micronúcleo.....	23
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 Material e Métodos.....	28
4.1 Preparação das peças da Liga Ti-6Al-4V	28
4.2 Preparação do Extrato da Liga Ti-6Al-4V	29
4.3 Linhagem utilizada e cultivo celular	30
4.4 Agentes Químicos	30
4.4.1 Mitomicina C (MMC)	30
4.4.2 Citocalasina B	30
4.4.3 MTT	31
4.5 Teste do MTT.....	31
4.6 Teste do Micronúcleo.....	35
4.7 Índice de Binucleação	37
4.8 Análise Estatística dos Resultados.....	38
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO.....	53
Referências.....	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A genética toxicológica (mutagênese) é uma área da ciência que busca identificar agentes potencialmente danosos ao material genético, bem como compreender seus mecanismos de ação e os efeitos biológicos decorrentes das alterações genéticas geradas. Atualmente, muitas ferramentas estão disponíveis para esse tipo de avaliação, tais como testes citogenéticos clássicos (teste do micronúcleo e de aberrações cromossômicas), estudos em microorganismos (teste de Ames) além de técnicas de biologia molecular, como o uso de PCR, microarranjos e estudos em genômica e proteômica.

O conhecimento acerca dos efeitos das mutações genéticas nos seres vivos passou a ser muito valorizado no meio científico, especialmente a partir do século XX, quando vários agentes indutores de danos no DNA começaram a ser identificados. Dentre esses agentes temos fatores químicos, físicos e biológicos, que são capazes de interagir com o material genético, causando alterações, cujas conseqüências podem ser imperceptíveis ou deletérias ao organismo, dependendo do grau dos danos ocasionados e da região do genoma afetada.

Em nosso cotidiano estamos constantemente submetidos à exposição de uma série de agentes potencialmente mutagênicos. A contaminação do ar e de fontes de água potável, os altos índices de radiação ultravioleta aos quais estamos submetidos, a presença excessiva de conservantes e corantes em nossos alimentos e hábitos como o tabagismo e o consumo de álcool são exemplos de fatores que nos colocam em contato direto com agentes capazes de causar modificações na informação genética presente em nossas células. Até mesmo em tratamentos médicos, muitas vezes somos expostos a agentes que podem de alguma forma determinar a geração de mutações.

Nesse contexto, podemos destacar o uso de implantes metálicos, empregados na medicina para o restabelecimento de funções perdidas por uma região do corpo em função de doenças, desgaste ou como resultado de acidentes. Esses implantes são geralmente constituídos de elementos biocompatíveis, com alta resistência e durabilidade. Porém, muitos dos elementos presentes na composição química destes biomateriais são capazes de ocasionar danos no DNA. Atualmente, o meio científico vem demonstrando grande preocupação no reconhecimento de biomateriais cuja composição química possa representar um risco à saúde do paciente, seja de forma aguda ou após longos períodos de utilização.

Essa preocupação se torna clara a partir da leitura da ISO 10993, que versa sobre os aspectos a serem abordados e as formas de condução de estudos com dispositivos e materiais

a serem utilizados na medicina. Esse instrumento de normatização internacional destaca, dentre vários outros tipos de avaliação, a realização de estudos de citotoxicidade, genotoxicidade e de toxicidade reprodutiva.

Dentre os diversos biomateriais utilizados atualmente como próteses e implantes em humanos, podemos destacar as ligas metálicas que apresentam o elemento Titânio (Ti) em sua composição. Essas ligas são amplamente utilizadas em função de sua alta resistência e durabilidade, estando entre as mais comuns. A liga Ti-6Al-4V (90 % Titânio, 6% Alumínio, 4% Vanádio) é uma das mais utilizadas como biomaterial e, como podemos observar, apresenta em sua composição, além do Titânio, os elementos Alumínio (Al) e Vanádio (V), metais reconhecidamente tóxicos para os sistemas vivos.

Assim, a necessidade de avaliações de citotoxicidade e de genotoxicidade desse tipo de material é imperativa, uma vez que íons metálicos provenientes dessas ligas podem ser liberados nos tecidos vivos adjacentes aos implantes e representar sérios riscos à saúde do indivíduo. Em longo prazo, doenças degenerativas como o câncer podem ser geradas em função dessa exposição, o que pode ser prevenido a partir de estudos biológicos mais profundos com os chamados biomateriais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

Em determinadas ocasiões, tais como acidentes, doenças ou desgaste natural, certas partes do corpo humano podem deixar de exercer suas funções de forma adequada. Em alguns casos o problema pode ser amenizado ou resolvido através do uso de implantes artificiais com a função de substituir a parte danificada (1).

Os materiais utilizados nesses implantes devem apresentar características especiais, sendo denominados genericamente de biomateriais. Basicamente, eles devem ser biocompatíveis, isto é, serem tolerados pelo organismo vivo, sem causar danos. Além disso, eles devem ser anatomicamente funcionais, apresentar alta resistência mecânica e química, possuir boa durabilidade e certa facilidade de fabricação, apresentar custo relativamente baixo e serem capazes de suportar, sem perder suas propriedades, pelo menos um dos vários métodos de esterilização. Esses materiais também devem ser resistentes à corrosão, uma vez que o contato com o meio fisiológico, que é extremamente agressivo, pode resultar em algum tipo de degradação (2)(3).

Segundo Silver e Doillon, os primeiros registros históricos da utilização de biomateriais datam de 4000 a.C. (4). Há registros de que os egípcios usaram placas metálicas para reparos em lesões cranianas e membros artificiais. Essas práticas também já foram identificadas durante o império romano e na idade média (5). O Quadro 1 mostra uma cronologia da utilização de implantes no mundo nos últimos 500 anos. Atualmente, para restaurar parte de tecidos danificados por algum tipo de trauma ou doença, os biomateriais têm sido amplamente utilizados em implantes dentários, próteses femorais, próteses cardíacas, dentre outras.

Quadro 1: Cronologia da utilização de implantes metálicos

Material	Data	Registro
Ouro	1565	Placa de ouro na reparação de palato partido
Ferro, Bronze e Ouro	Por volta de 1650	Arames finos de ferro, bronze e ouro usados em suturas
Bronze	1775	Implantes internos de bronze
Aço	1886	Placas perfuradas de aço com superfície niquelada, permitindo fixação ao osso por parafusos
Aço Inoxidável	1926	Próteses de aço inoxidável
Cobalto, Cromo, Molibdênio e Carbono	1936	Próteses de ligas a base de Co-Cr-Mo-C
Titânio	A partir de 1960	Início do uso do titânio em próteses, tornando-se significativo após a metade da década seguinte.

Fonte: (6)

Poucos são os materiais que atendem às exigências de força, resistência à corrosão, biocompatibilidade e textura exigidos para que possam ser empregados em implantes (7). Uma premissa básica é que os biomateriais metálicos, incluindo implantes ortopédicos, não devem causar respostas prejudiciais ao hospedeiro, como necrose tecidual, osteólise, reabsorção óssea e formação de membrana fibrótica espessa, situações essas que indicam baixa biocompatibilidade (8).

Algumas das ligas metálicas aplicadas como biomaterial que são bem aceitas clinicamente incluem: cobalto-crômio, para próteses parciais removíveis e ortopédicas; os aços inoxidáveis, para a construção de aparelhos ortopédicos; e as ligas de titânio, para implantes dentários e ortopédicos. Esses biomateriais, quando implantados, ficam submetidos a esforços mecânicos em ambientes agressivos, decorrentes de fatores como a placa bacteriana, a saliva na cavidade bucal e os fluidos fisiológicos do organismo. Assim, é necessário o emprego de diversas técnicas para avaliação da resistência ao desgaste e à corrosão desses materiais, uma vez que os produtos desses processos são os principais responsáveis pelo comprometimento da biocompatibilidade, que deve ser local e sistêmica (9).

2.2 Titânio e outras ligas metálicas como biomateriais

O aço inoxidável, o titânio comercialmente puro, a liga Ti-6Al-4V e as ligas de cobalto-cromo são alguns dos materiais mais utilizados em implantes nos Estados Unidos (7). No Brasil, de modo semelhante, o metal mais utilizado para implantes ortopédicos, ainda é o aço inoxidável. Um dos tipos desse material (18% de cromo, 8% de níquel e o contrapeso composto principalmente de ferro) foi utilizado em cirurgia ortopédica pela primeira vez em 1926. Em 1947, foi introduzida uma importante modificação nas ligas de aplicações ortopédicas, que foi a introdução de molibdênio (2 a 4% na fórmula anterior) na composição do aço inoxidável, proporcionando um incremento da resistência à corrosão (7).

Apesar de relatos do uso do titânio e suas ligas terem ocorrido já na década de 1940(7), Gottlieb e Leventhal em 1951 e Clarke e Hickman em 1953 foram alguns dos primeiros pesquisadores a constatar que o titânio é um metal com muito potencial para aplicações biomédicas, devido à sua força superior, resistência à corrosão, aceitação pelos ossos e tecidos moles e tendência a “aderir” ao osso gradativamente ao longo do tempo (10).

Em 2003, Vercik et al publicaram que o titânio comercialmente puro (Ti-cp) e algumas de suas ligas são considerados de grande importância na área médica devido a sua excelente biocompatibilidade e propriedades mecânicas (11).

O titânio comercialmente puro é considerado o melhor material para a confecção de implantes do ponto de vista tecidual (osseointegração), mas devido às suas propriedades físicas, ele não é o material ideal para suportar cargas (12). A quebra de parafusos confeccionados com titânio puro, em decorrência da baixa resistência torsional (torção) deste metal, levou ao uso da liga Ti-6Al-4V (7), originalmente desenvolvida para aplicações aeroespaciais (13). Segundo Albuquerque e Albuquerque, a liga Ti-6Al-4V é um dos materiais destinados a implantes ortopédicos cujas características mais se aproximam das idéias para funcionar como parte integrante do osso (14).

A liga Ti-6Al-4V possui limite de resistência à fratura cerca de 6 (seis) vezes maior que o titânio comercialmente puro, apesar de induzir menor taxa de osseointegração e maior susceptibilidade à corrosão *in vivo* (15). Entretanto, ensaios eletroquímicos mostraram que a liga Ti-6Al-4V possui resistência à corrosão em meio fisiológico (9). Outras ligas de titânio, que incluem outros elementos como tântalo, zircônio, nióbio ou molibdênio, com o intuito de melhorar algumas propriedades, também são utilizadas (16)(17).

Pesquisas demonstraram que a inclusão de nióbio em ligas de titânio resulta em aumento da resistência à corrosão, principalmente após tratamento de oxidação, devido à formação de uma camada protetora de óxido de nióbio na superfície do implante (16). Outros estudos analisaram a substituição de elementos como alumínio e/ou vanádio com o objetivo de reduzir a toxicidade do implante (17).

Implantes de titânio e suas ligas podem ser recobertos com materiais cerâmicos como hidroxiapatita e fosfato de cálcio, com o objetivando-se aumentar suas características de osseointegração (18)(19)(20).

Um recente estudo *in vivo* identificou a liberação de íons metálicos por mini-implantes ortodônticos moldados com a liga Ti-6Al-4V em fluidos corporais de coelhos (21). Esses autores demonstraram que quantidades variadas de Ti, Al e V foram detectadas em diferentes órgãos (rins, fígado e pulmões) dos animais tratados, comprovando a possibilidade de liberação de íons metálicos por esse tipo de implante. Porém, apesar da tendência de liberação de íons pela liga de titânio, as quantidades de metais detectadas foram extremamente baixas.

Okazaki et al., em um estudo comparativo *in vivo* de implantes constituídos por duas diferentes ligas metálicas, demonstraram que a corrosão observada na superfície do implante da liga Ti-6Al-4V foi ligeiramente maior que a do implante de Ti-15Zr-4Nb-4Ta (22). Em um estudo posterior no ano de 2004, Okazaki et al., avaliaram a concentração de íons liberados no tecido ósseo após a implantação e posterior à remoção dos implantes em tíbia de ratos, e verificaram que a concentração de íons metálicos no tecido ósseo foi menor nos ossos implantados com os implantes de Ti-15Zr-4Nb-4Ta, indicando que esta liga é vantajosa para implantes de longa duração (23).

Cai et al., estudando as superfícies do titânio comercialmente puro (titânio-cp) e das ligas Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb e Ti-13Nb-13Zr, descrevem que todas demonstraram uma excelente resistência à corrosão na simulação de um ambiente bucal (24).

Para Zaffe, Bertoldi e Consolo, após observarem em pacientes a liberação de alumínio da liga Ti-6Al-4V e seu acúmulo no organismo, sugeriram que somente novos estudos qualitativos e mais aprofundados com animais e diferentes tipos de biomateriais contendo alumínio seriam capazes de responder as perguntas sobre esse tema (25).

Em um ensaio de viabilidade celular utilizando células 3T3 e as ligas Ti-6Al-4V e Ti-7.5Mo (onde as células foram cultivadas sobre discos feitos com a ligas e em extratos das

mesmas), demonstrou-se que as ligas não induziram morte celular aparente. Concluiu-se que a liga Ti-7.5Mo pode ser uma excelente candidata a aplicações médicas (26).

Segundo Taddei et al., a tendência atual das pesquisas para o desenvolvimento de implantes ortopédicos baseia-se na busca de ligas de titânio com baixo módulo de elasticidade, o mais próximo do osso e isentas de elementos como o alumínio e o vanádio (13). Dentre as ligas de titânio desenvolvidas recentemente destaca-se a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta, por apresentar baixo módulo de elasticidade, boa resistência mecânica e elevada biocompatibilidade. De acordo com Taddei et al. essa mesma liga não apresentou citotoxicidade em testes *in vitro* realizados com células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1) (27).

De acordo com Niinomi, a citotoxicidade e o limite de fadiga da liga Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr é semelhante à do Ti puro e menor que a do Ti-6Al-4V. Com base nos dados obtidos de fadiga e tensão, os autores propõem que a liga Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr pode ser considerada um biomaterial promissor (28).

As ligas NiTi são utilizadas em várias aplicações biomédicas, como por exemplo, fios de aparelhos ortodônticos. Estudos de mutagenicidade com extratos dessa liga não demonstraram alterações significativas na frequência de alterações genéticas (29).

2.3 Princípios de Mutagênese

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é o material genético de todos os seres vivos e de muitos vírus, sendo a seqüência de bases nitrogenadas a forma na qual a informação genética é armazenada (30). Por apresentar essa função fundamental, o DNA apresenta sistemas específicos de proteção, sendo a única molécula biológica que apresenta um mecanismo próprio para prevenção e reparo de falhas em seu metabolismo (31). Entretanto, ainda assim está sujeito a mutações que, segundo Zaha, são alterações súbitas no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética preexistente (32). Estas alterações, segundo Lewin podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou devidas à exposição do organismo a agentes químicos ou físicos (mutações induzidas) (30).

As mutações estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas tais como câncer e arteriosclerose (33), (34), razão essa que explica o grande interesse que esses eventos despertam no meio médico e científico.

O processo de desenvolvimento de um câncer, que envolve conversão de células normais em células neoplásicas, normalmente depende da ocorrência de vários estágios. Uma das fases iniciais desse processo envolve a ação de um carcinógeno genotóxico (35). Entretanto, segundo Alberts et al., uma única mutação não é suficiente para converter uma célula sadia típica numa célula cancerosa (36). Eles afirmam que várias evidências indicam que a gênese de um câncer requer, como regra geral, que vários acidentes raros e independentes ocorram juntos em uma célula.

Em nosso cotidiano estamos constantemente em contato com agentes genotóxicos como a radiação ultravioleta proveniente do sol, contaminantes presentes no ar e na água ou mesmo elementos presentes em nossa dieta. Além disso, estima-se que milhões de trabalhadores são expostos ocupacionalmente a compostos químicos com conhecida ação mutagênica e/ou carcinogênica (37)(38). Por exemplo, existem relatos de estudos que comprovam os riscos aos quais estão sujeitos os agricultores em função do uso constante de pesticidas, agentes químicos que têm demonstrado citotoxicidade e genotoxicidade em células (39)(40)(41), e toxicidade fetal elevada em camundongos (42)

A avaliação da genotoxicidade pode ser realizada nos diferentes passos de interação do agente mutagênico com o DNA ou de seus efeitos. A capacidade do composto se ligar ao material genético pode ser avaliada pela observação de aductos no DNA; a capacidade de quebrar o DNA pode ser estimada por eluição alcalina ou pelo teste do Cometa e as mutações cromossômicas e/ou genômicas podem ser quantificadas pelos testes do micronúcleo ou aberrações cromossômicas (43).

Segundo Gebhart, as metodologias citogenéticas clássicas usadas para avaliar a mutagenicidade de agentes químicos e físicos em mamíferos também podem ser empregadas para avaliação e identificação de agentes antimutagênicos (44). Gebhart e Kuroda et al. reportaram a importância do uso destes sistemas, principalmente para avaliar o mecanismo de ação de agentes antimutagênicos e anticlastogênicos usando diferentes tratamentos com agentes químicos (44) (45).

2.4 Sistema de cultura de células de mamíferos *in vitro*.

Vários são os sistemas de cultivo celular empregados para a identificação de compostos mutagênicos e/ou antimutagênicos (45). De acordo com Takahashi, dentre os tipos celulares mais empregados, podem-se destacar linfócitos de sangue periférico humano e

linhagens provenientes de Hamster Chinês, como por exemplo, as linhagens CHO (células de ovário) e V79 (fibroblastos de pulmão) (46).

A facilidade de padronização das diferentes condições experimentais (temperatura, pH, atmosfera, disponibilidade nutricional e densidade populacional) é uma das grandes vantagens do emprego de sistemas *in vitro* para realização de estudos biológicos. Essa facilidade é diretamente influenciada pela uniformidade metabólica e comportamental das culturas celulares, o que garante a possibilidade de estudos diferenciais quanto às diferentes fases do ciclo celular, bem como economia, rapidez, boa reprodutibilidade. Além disso, as células cultivadas mantêm suas características quanto à organização dos cromossomos e quanto à estrutura de seu DNA, que se mantêm idênticos aos encontrados nos tecidos *in vivo* (47).

As linhagens obtidas a partir de Hamster Chinês apresentam algumas vantagens adicionais, que propiciam sua utilização em estudos de genotoxicidade, dentre as quais podem ser destacadas a facilidade de crescimento durante o cultivo, o pequeno número cromossômico e um ciclo celular curto (10 a 14 horas, aproximadamente). Entretanto, algumas desvantagens também devem ser destacadas, como a ocorrência de variações de cariótipo, populações celulares assíncronicas e uma variação na duração do ciclo celular (48). Porém, essas desvantagens não inviabilizam sua utilização, o que pode ser comprovado pelo grande número de trabalhos científicos recentes empregando essas linhagens em avaliações de genotoxicidade e antigenotoxicidade (49)(50)(51).

Grande parte das linhagens empregadas em ensaios *in vitro* não apresentam a capacidade de metabolizar compostos xenobióticos, havendo, muitas vezes, a necessidade de adição de sistemas exógenos para executar essa função, como por exemplo a fração S9 (fração microsomal obtida a partir de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254) (52) (48).

Os sistemas *in vitro* têm se mostrado bastante eficientes na identificação de compostos genotóxicos ambientais, apesar de sistemas *in vivo* serem mais eficientes por reproduzirem condições mais próximas àquelas observadas em seres humanos (45). Nem sempre um resultado positivo *in vitro* será observado *in vivo*, porém sua ocorrência serve de alerta e permite, de forma mais clara, a identificação de informações acerca dos mecanismos de ação de agentes ao interagirem com o DNA, bem como o nível de sua toxicidade (46).

2.4 Teste do Micronúcleo

Os micronúcleos foram estudados primeiramente por Howell em 1891, sendo considerados como inclusões do citoplasma observadas em células vermelhas do sangue de gatos portadores de anemia. Posteriormente, em 1901, Jolly observou essas mesmas alterações em estudos com eritrócitos de embriões de ratos (53).

As pesquisas com micronúcleos têm sido usadas freqüentemente para quantificar a exposição à radiação ou à agentes químicos (54)(55), sendo exigido como primeiro ensaio a ser realizado em uma variedade de procedimentos sugeridos por várias agências de pesquisa em todo o mundo, quando se tem por finalidade analisar a mutagenicidade (56).

Para Heddle et al. a origem dos micronúcleos podem decorrer de diferentes mecanismos, envolvendo quebras cromossômicas, num processo denominado clastogênese, ou devido à falhas no metabolismo das fibras do fuso mitótico, o que recebe o nome de aneuploidogênese (57). Esses eventos irão propiciar a formação de um núcleo de pequeno tamanho, envolto por membrana, separado do núcleo principal, mas corado similarmente a este, devido ao seu conteúdo de DNA (53). Atualmente, com a utilização de marcadores específicos para o cinetócoro na análise de micronúcleos, é possível a inferência do mecanismo de origem dessas alterações genéticas, diferenciando quebras cromossômicas de aneuploidias (58).

Os micronúcleos podem ser originados de forma espontânea, mas a sua indução é freqüentemente utilizada para se determinar danos genotóxicos como resposta a exposição à agentes mutagênicos (57)(55).

O teste do micronúcleo pode ser utilizado como uma alternativa aos estudos de aberrações cromossômicas. Mas somente um número reduzido dos possíveis tipos de aberrações cromossômicas podem ser identificadas na forma de micronúcleos (59).

O teste de aberração cromossômica em linfócitos humanos foi por muito tempo utilizado como verificador de mutações no material genético, porém essa metodologia necessita de um tempo maior para ser realizada. Neste cenário fica evidente a importância do teste de micronúcleo por ser um procedimento mais rápido e de maior facilidade de análise.

Fenech e Morley propuseram uma metodologia para avaliação de micronúcleos *in vitro* envolvendo o emprego de citocalasina-B (60). As citocalasinas impedem a polimerização da actina, bloqueando o processo de citocinese (36). A descoberta da citocalasina por Carter se deu pela observação de que, na presença desse composto, as células

de camundongos, *in vitro*, não realizavam citocinese, sem que houvesse, porém, um impedimento do processo mitótico (61).

Induzindo o bloqueio da citocinese em sua metodologia (Figura 1), Fenech e Morley (60) propuseram uma maneira de resolver o problema de sincronia da mitose em culturas celulares. Essa abordagem permite a identificação de quantas divisões mitóticas foram realizadas por uma célula após os tratamentos experimentais.

Para Fenech seria necessário o dobro de células mononucleadas para se observar a mesma quantidade de danos observada em células binucleadas (62). Segundo Fenech alguns critérios devem ser levados em consideração no momento da análise dos micronúcleos tais como, o número de células binucleadas, o número total de micronúcleos em cada célula binucleada e a frequência de MN em 1000 células binucleadas (63). Além disso, segundo este mesmo autor, um micronúcleo deve estar totalmente isolado e apresentar morfologia e coloração idênticas aos núcleos principais, com seu diâmetro variando entre 1/16 e 1/3 das medidas desses (Figura 2).

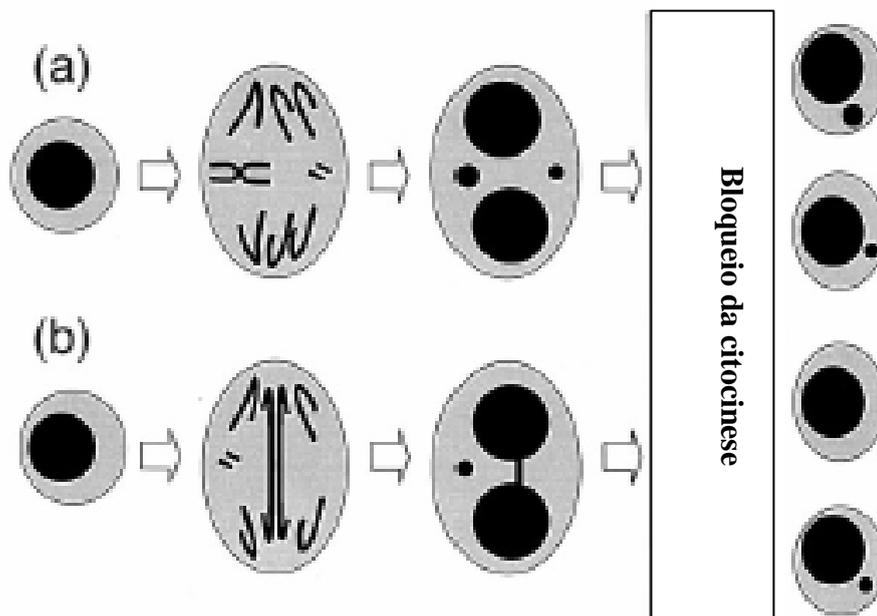


Figura 1: (a) Diagrama mostrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro; (b) a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico

Fonte: (63)

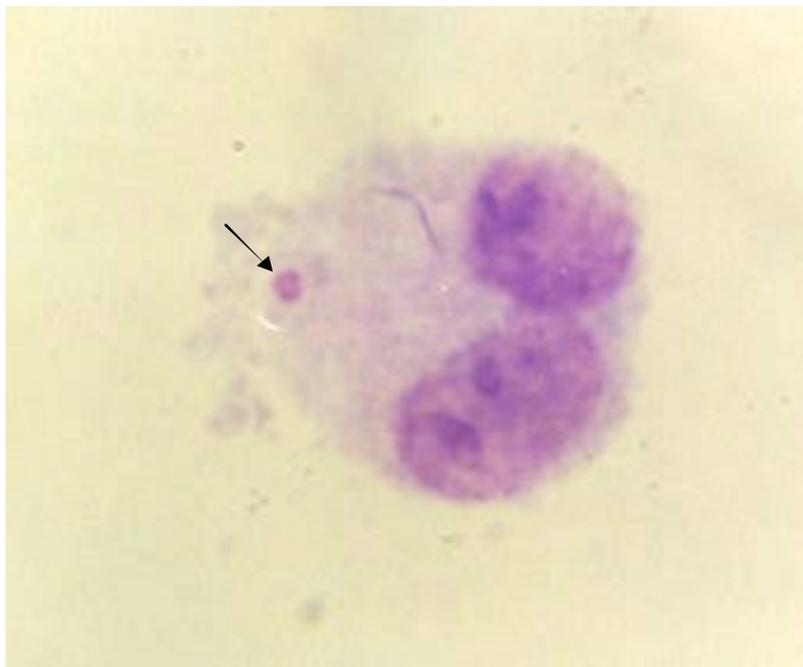


Figura 2: Célula CHO-K1 binucleada com micronúcleo (1000x).

É importante destacar que além de linfócitos do sangue periférico, podem ser usadas várias linhagens celulares para a realização do teste do micronúcleo *in vitro*. Vale a pena ressaltar as linhagens CHO (Chinese Hamster Ovary), CHL/IU (Chinese Hamster Lung) e V79, amplamente utilizadas e recomendadas para este teste. Segundo estudos de Miller et al. que coletaram dados fornecidos por quatro companhias farmacêuticas, a partir de ensaios realizados em linhagens celulares de Hamster Chinês (células V79, CHO-K5, CHO-K1), e também linfócitos humanos, cuja comparação entre as frequências de aberrações cromossômicas e micronúcleos entre essas linhagens celulares, mostrou-se uma correlação positiva em cerca de 88% de coincidência para os testes realizados em 57 compostos (64). Estes resultados apontam a validade dos ensaios e a sensibilidade dos sistemas celulares empregados.

Mais recentemente, variações nas metodologias vêm sendo propostas para aumentar a eficiência desse teste (Figuras 3 e 4). Estudos na área de análise de imagem e citometria de fluxo vêm ganhando espaço com a finalidade de agilizar o emprego dessa metodologia e permitindo maior confiabilidade. Conforme Hayashi, et al., pode-se esperar que a citometria de fluxo e técnicas de análises de imagem venham substituir a contagem realizada na microscopia, provendo assim dados mais seguros (65). Porém, sistemas rigorosos e adequados

de validação precisam ser adotados para garantir qualidade na contagem automatizada dos micronúcleos.

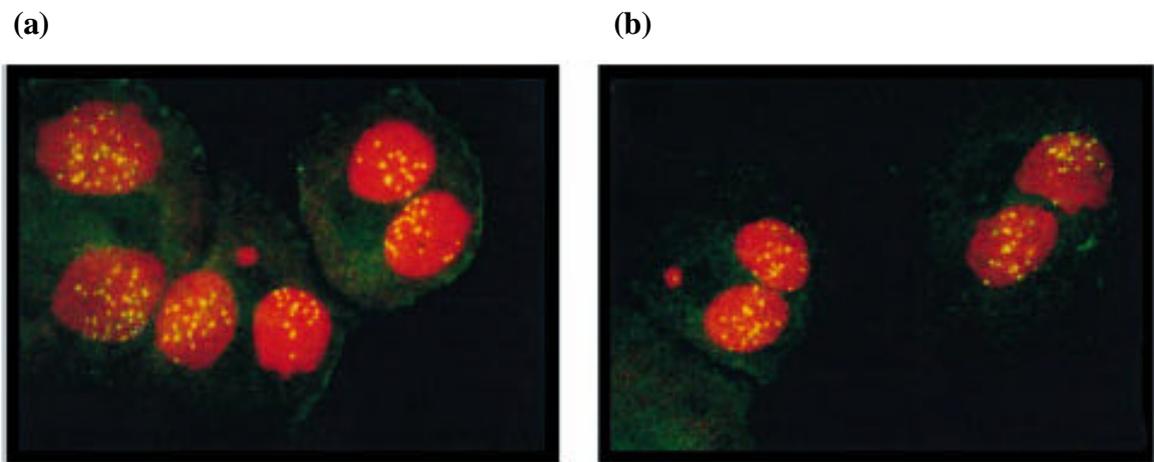


Figura 3: Células CHO-K1 binucleadas marcadas com anticorpos anti-cinetócoro (pontos amarelos). (a) Células binucleadas e um micronúcleo cinetócoro-negativo é indicado. (b) Um micronúcleo cinetócoro-positivo é mostrado.

Fonte: (66).

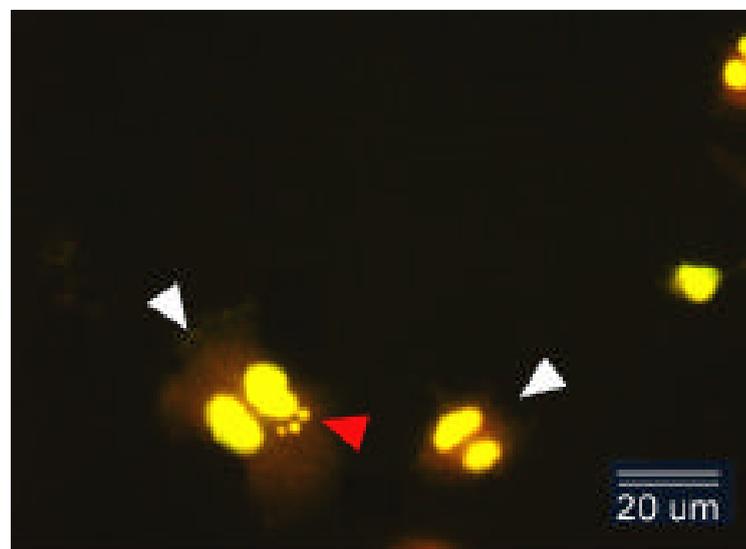


Figura 4: Células CHO-K1 binucleadas típicas (setas brancas) e micronúcleos (seta vermelha).

Fonte: (67)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a citotoxicidade e a mutagenicidade de um extrato obtido a partir da liga metálica Ti-6Al-4V.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de um extrato obtido a partir da liga Ti-6Al-4V, empregando-se o teste de viabilidade celular (MTT) em culturas de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1);
- Avaliar a mutagenicidade de diferentes concentrações desse extrato, empregando-se o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese em culturas de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1);
- Verificar a influência da exposição das culturas CHO-K1 ao extrato da liga Ti-6Al-4V no processo de divisão mitótica, estabelecendo-se o Índice de Binucleação;
- Padronizar e implantar a metodologia do Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese em culturas de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1) no laboratório de Genética Toxicológica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação das peças da Liga Ti-6Al-4V

As peças da liga Ti-6Al-4V utilizadas no presente estudo (Figura 5) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Alfeu Saraiva Ramos, Líder do Grupo de Pesquisa em Síntese de Materiais Nanoestruturados do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

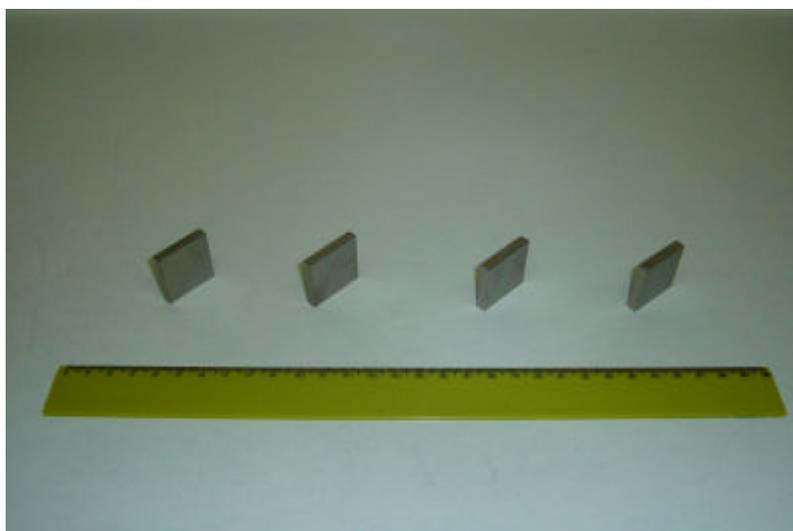


Figura 5: Peças da Liga Ti-6Al-4V

A decapagem das peças da liga Ti-6Al-4V foi realizada dentro das normas da ASTM E 407, Ataque 187, empregando-se uma mistura de 50 mL de água destilada, 10 mL de ácido fluorídrico e 30 mL de ácido nítrico, em um béquer de polipropileno. Cada uma das peças foi submersa três vezes nessa mistura e posteriormente lavada de forma abundante em água corrente. Em seguida, as peças foram mantidas por 15 minutos em álcool etílico absoluto, seguindo-se uma lavagem em água destilada e outra em água ultra pura (MiliQ), finalizando o processo. Esse procedimento é recomendado para a total eliminação de possíveis impurezas e contaminantes químicos.

Após a decapagem as peças foram cuidadosamente medidas com um paquímetro, obtendo-se as seguintes medidas: 2,7 cm x 2,6 cm x 0,5 cm, totalizando uma área superficial de 18,7 cm² para cada uma delas. Cada uma das peças foi então colocada individualmente em

frascos de borossilicato (Schott Duran) com tampa de rosca e esterilizadas em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

4.2 Preparação do Extrato da Liga Ti-6Al-4V

A obtenção do extrato da liga Ti-6Al-4V foi realizada de acordo com a norma ISO 10.993-12, que versa sobre a preparação de amostras e materiais de referência para estudos de avaliação biológica de produtos para a saúde. Assim, em cada um dos frascos contendo as peças da liga metálica foram colocados 14,96 mL de meio de cultivo celular Ham-F12 (Gibco BRL) estéril, sem soro fetal bovino, obedecendo a proporção de 1,25 cm² de área superficial para cada mL de agente extrator.

Os frascos foram então colocados sob agitação orbital (Shaker Cientec CT 712-R – Figura 6) a 90 rpm e 37°C de temperatura, por 144 horas (6 dias). Após esse processo, as peças metálicas foram retiradas dos frascos e os extratos obtidos foram mantidos a -20°C. O meio de cultura utilizado nos experimentos como controle negativo foi submetido aos mesmos procedimentos, porém sem manter contato com a liga Ti-6Al-4V.



Figura 6: Frascos sob agitação e temperatura controladas para obtenção do extrato da liga Ti-6Al-4V

4.3 Linhagem utilizada e cultivo celular

No presente estudo foram utilizadas células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1) obtidas do Instituto Adolfo Lutz. O crescimento celular foi realizado em meio de cultura completo, constituído de Ham-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1,2 g/L de bicarbonato de sódio (Synth) e 1% de solução de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Sigma). A manutenção das células foi realizada em frascos de cultivo celular de 25 cm² (SPL), a 37°C e 5% CO₂. Nestas condições, o tempo do ciclo celular da linhagem CHO-K1 é de aproximadamente 12h.

4.4 Agentes Químicos

4.4.1 Mitomicina C (MMC)

A Mitomicina C (MMC – Sigma – CAS: 50-07-7) é um agente químico de conhecida ação genotóxica, que atua ocasionando, principalmente, ligações cruzadas intercadeia no DNA e trocas entre cromátides irmãs. Esse composto foi utilizado como agente indutor de danos nos grupos controle-positivo do presente trabalho, dissolvido em PBS (pH 7,4), numa concentração final de 0,3 µg/mL.

4.4.2 Citocalasina B

A Citocalasina B é um produto obtido a partir do *Dreschlera dematioidea*. Esse composto tem a capacidade de impedir a polimerização dos filamentos de actina. Assim, quando células em divisão celular são tratadas com essa substância o resultado é a formação de células binucleadas, uma vez que a não polimerização da actina vai ocasionar o bloqueio da citocinese.

Em nossos estudos, a citocalasina B (Sigma – CAS–14930-96-2) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO - Synth) para obtenção da solução estoque (2 mg/mL). A partir da solução estoque foi obtida a solução de uso (300 µg/mL), diluída em PBS. A concentração final utilizada para realização do teste do micronúcleo, observada nas placas de cultivo celular durante os experimentos, foi de 2,1 µg /mL.

4.4.3 MTT

O MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido)), (Sigma) é um sal solúvel em água. O mesmo reage com as desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas, isto é, vivas, resultando na produção de cristais de formazan de cor roxa, insolúveis em água. Esse sal é, portanto, utilizado para verificar a viabilidade celular. No presente trabalho o MTT foi diluído em PBS, numa concentração final de 5 mg/mL.

4.5 Teste do MTT

No presente estudo, para determinação do potencial citotóxico do extrato obtido da liga metálica Ti-6Al-4V, foi realizado o teste de viabilidade celular por MTT em culturas de células CHO-K1 (Figuras 7, 8 e 9). Os experimentos foram realizados em sextuplicata utilizando-se placas de 96 poços.

Para realização do teste do MTT, uma garrafa de cultivo celular, mantida como descrita anteriormente, teve seu meio de cultura descartado. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, seguindo-se o processo de tripsinização. A tripsina (Gibco BRL – 0,005%) é uma enzima que cliva as proteínas da matriz extracelular, resultando no desprendimento das células da superfície interna do frasco.

O conteúdo da garrafa foi então removido, colocado em um tubo de centrífuga (tipo Falcon, 15 mL) e centrifugado (centrífuga Excelsa Baby I 206 – FANEM, SP, Brasil), a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspendido em 3 mL de

meio de cultura completo. Dessa suspensão celular foram retirados 10 μ l, os quais foram misturados à 90 μ l de Azul de Tripán, para contagem e avaliação da viabilidade celular utilizando-se uma Câmara de Neubauer (Poly Labs). Após a contagem celular, foi feita uma diluição das células da cultura, para se obter uma suspensão com $2,5 \times 10^5$ células viáveis por mL.

Em duas placas independentes de 96 poços foram semeadas 30 poços (em cada) contendo cada um 0,1 mL da suspensão celular ($2,5 \times 10^4$ células viáveis). Essas placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas.

Para cada placa foram realizados os seguintes procedimentos. Após as 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram realizados os tratamentos. Foram estabelecidos 5 grupos experimentais, sendo que, para cada um deles, foram utilizados 6 poços. Os poços do grupo controle negativo receberam 0,1 mL de meio de cultura sem soro. Foram estabelecidos 4 grupos de tratamento com o extrato da liga metálica (100%, 75%, 50% e 25%), sendo que, nos poços foram colocados 100, 75, 50 e 25 μ L, respectivamente. O volume final em cada poço foi de 100 μ L, completados, quando necessário, com meio de cultura sem soro para se obter as concentrações desejadas. Foram reservados 6 poços, onde não foram adicionadas células que, posteriormente, vieram a constituir o “branco” na análise de espectrofotometria.

Após 2 horas do início dos tratamentos, o meio de cultura dos poços foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em cada um dos poços foram adicionado 0,2 mL de meio de cultura completo (com soro). Após um período de 24h, para uma das placas de 96 poços e 48h para a segunda placa de 96 poços, realizou-se os procedimentos que segue. O meio de cultura dos poços foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, foi adicionado 100 μ L de MTT na concentração de 0,5 mg/mL, diluído em PBS. Foram adicionados 100 μ L de MTT nos poços reservados para o “branco”. As placas foram incubadas por um período de 1 hora. Foram adicionados 200 μ L do solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO Synth) em todos os poços contendo MTT, com o objetivo de dissolver os cristais de formazan potencialmente formados. Para otimizar a dissolução dos cristais, as células foram mantidas sob agitação orbital em Shaker (Cientec – Figura 3) durante 20 minutos, a temperatura ambiente.

Após este período foi efetuada a leitura das placas em espectrofotômetro de Elisa Spectracount (Packard, USA), utilizando filtro de 570 nm. Os dados obtidos desta leitura foram relativos à absorbância em cada um dos poços. Após a leitura, foi calculado um índice de viabilidade celular, demonstrando a porcentagem de células vivas após cada tratamento.

Como para cada tratamento foi realizado em seis repetições, foi utilizada a média das absorbâncias em todas as repetições e de todos os tratamentos.

O índice de viabilidade celular foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Tratado - Branco}}{\text{Controle - Branco}} \times 100$$

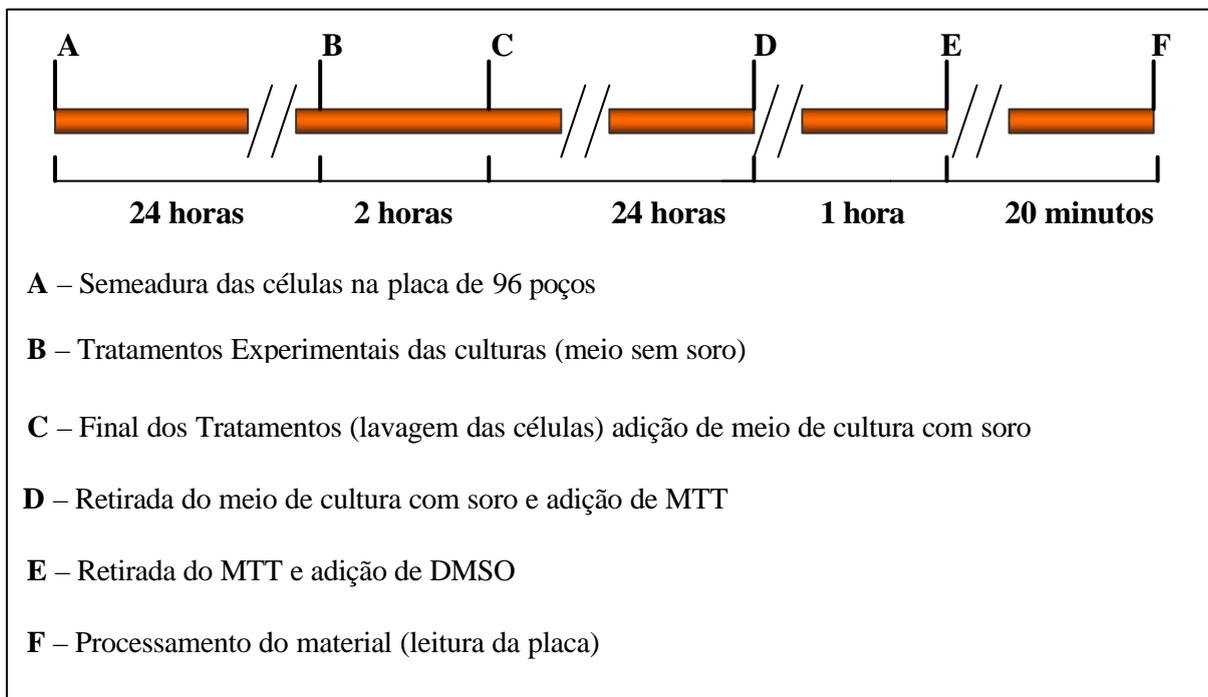


Figura 7: Resumo Esquemático do Protocolo empregado para o Teste de MTT de 24h.

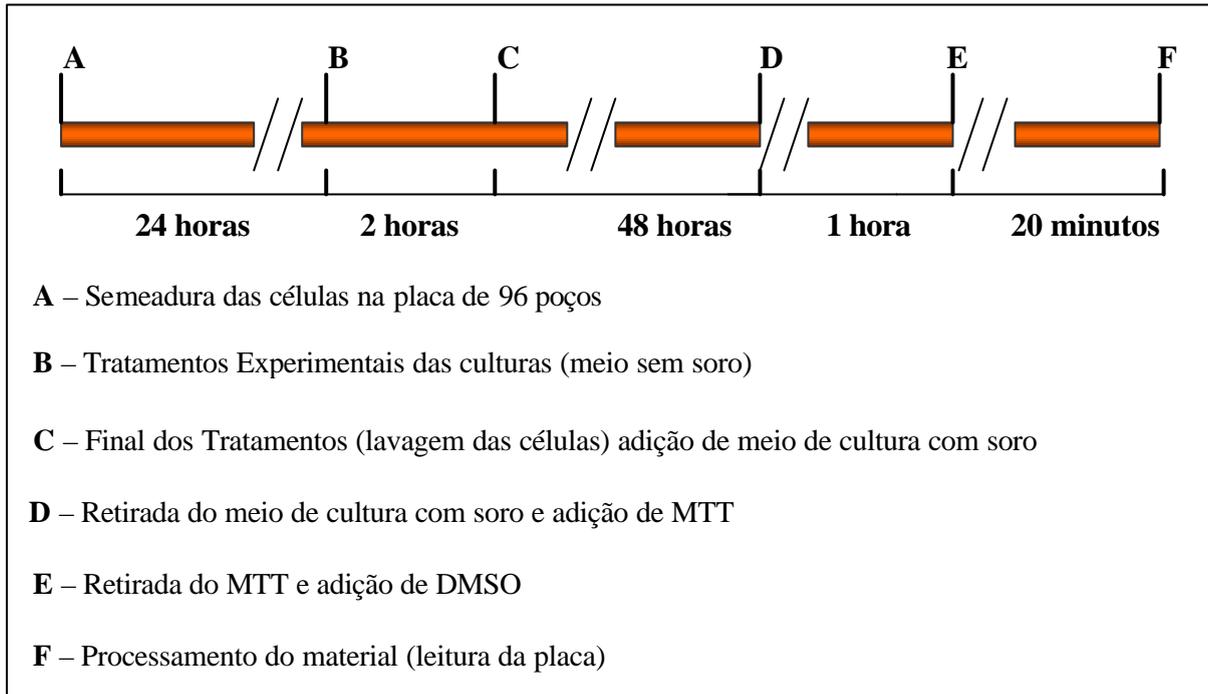


Figura 8: Resumo Esquemático do Protocolo empregado para o Teste de MTT de 48h.

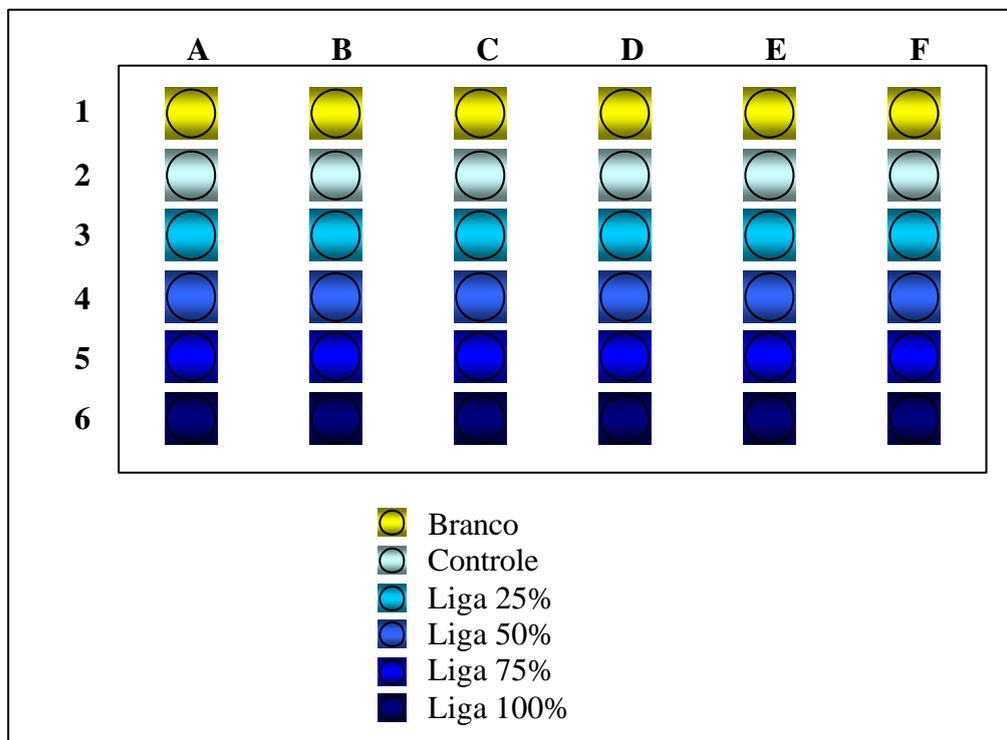


Figura 9: Esquema de montagem das placas para o Teste de MTT.

4.6 Teste do Micronúcleo

No presente estudo, para determinação do potencial mutagênico do extrato obtido da liga metálica Ti-6Al-4V, foi realizado o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese em culturas de células CHO-K1, seguindo o protocolo descrito por Wang e Hung, com adaptações (Figura 10) (68). Foram realizados três experimentos totalmente independentes.

Em cada um dos experimentos, uma garrafa de cultivo celular, mantida como descrita anteriormente, teve seu meio de cultura descartado. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, seguindo-se o processo de tripsinização. A tripsina (Gibco BRL – 0,005%) é uma enzima que cliva as proteínas da matriz extracelular, resultando no desprendimento das células da superfície interna do frasco.

O conteúdo da garrafa foi então removido, colocado em tubo de centrifuga (tipo Falcon, 15 mL) e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 3 mL de meio de cultura completo. Dessa suspensão celular foram retirados 10 µl, os quais foram misturados à 90µl de Azul de Trypan, para contagem e avaliação da viabilidade celular utilizando-se uma Câmara de Neubauer. Após a contagem celular, foi feita uma diluição das células da cultura, para que se obter uma suspensão com 2×10^5 células viáveis por mL.

Para cada experimento independente foram montadas 10 placas de cultura (35 mm de diâmetro), contendo uma lamínula (20 x 20 mm) e 1 mL da suspensão celular (2×10^5 células viáveis). Estas placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 25 horas (2 ciclos celulares completos).

Transcorrido esse tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram realizados os tratamentos. Foram estabelecidos 5 grupos experimentais, sendo que, para cada um deles, foram montadas 2 placas de cultura. As placas do grupo controle negativo receberam 1 mL de meio de cultura sem soro e as do grupo controle positivo foram preenchidas com 1 mL de meio de cultura sem soro contendo mitomicina C (0,3 µg/mL). Foram montadas 6 placas para os grupos de tratamento com o extrato da liga metálica, cada uma delas recebendo um volume de 1 mL. Duas delas foram preenchidas com 1 mL do extrato puro (extrato 100%); outras duas com 0,75 mL do extrato e 0,25 mL de meio de cultura sem soro (extrato 75%); mais duas placas receberam 0,5 mL do extrato e 0,5 mL de meio de cultura sem soro (extrato 50%).

Após 2 horas do início dos tratamentos, o meio de cultura das placas foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em cada uma das placas foi adicionado 1 mL

de meio de cultura completo (com soro), contendo citocalasina B (2,1 µg/mL). Passadas mais 15 horas, o meio de cultura das placas foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 2 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1%, por 10 minutos. Após a hipotonização as células foram fixadas em 2 mL de uma solução de metanol (Merck) e ácido acético (Dinâmica) (20:1).

Após a fixação, as células aderidas às lamínulas foram secas ao ar e posteriormente coradas com giemsa 5% em tampão Sörensen (Na_2HPO_4 0,06 M; KH_2PO_4 0,06 M, pH 6,8) por 15 minutos. Após o período de coloração, as lamínulas foram lavadas em água destilada e secas ao ar, para posteriormente serem montadas lâminas permanentes para análise microscópica (Leica-DMLB). Para cada um dos tratamentos foram analisadas 1000 células binucleadas, observadas em objetiva de imersão, com um aumento de 1000 vezes, anotando-se o número de células micronucleadas.

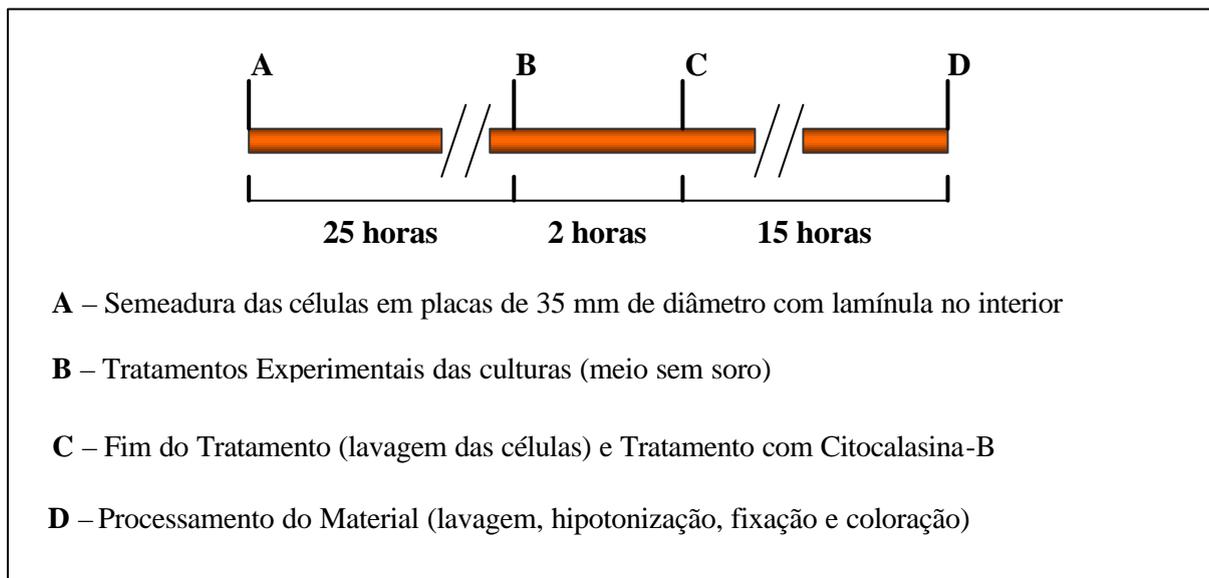


Figura 10: Resumo Esquemático do Protocolo empregado para o Teste do Micronúcleo

4.7 Índice de Binucleação

No presente estudo, para determinação da influência do extrato obtido da liga metálica Ti-6Al-4V no processo de divisão mitótica, foi calculado o Índice de Binucleação em culturas de células CHO-K1, utilizando-se as mesmas lâminas empregadas na análise de MN (Figura 11).

Para cada um dos tratamentos utilizados, conforme protocolo descrito anteriormente para o teste do MN, foram analisadas 500 células por lâmina. Considerando-se que os experimentos foram realizados em triplicatas, 1500 células foram analisadas, no total, para cada tratamento. Estas células foram observadas ao microscópio (Leica-DMLB) com um aumento de 400 vezes, anotando-se o número de células nitidamente binucleadas.

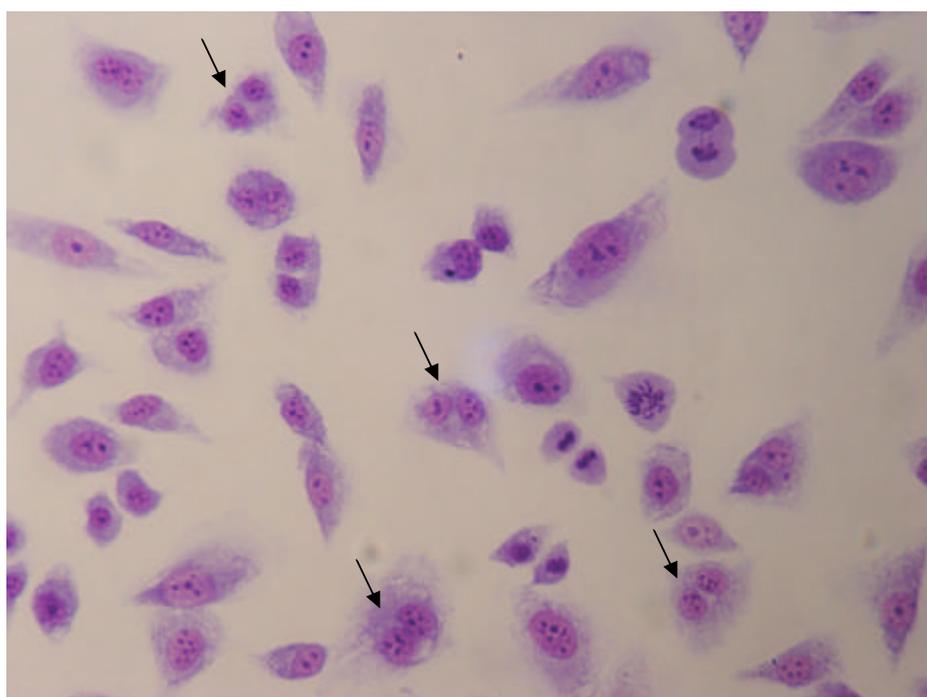


Figura 11: As setas indicam exemplos de Células CHO-K1 binucleadas (400x).

4.8 Análise Estatística dos Resultados

Para a análise estatística dos resultados obtidos em todos os estudos realizados empregou-se o software INSTAT (Graphpad Versão 3.00, 1997). Para a análise de viabilidade celular (MTT) e do Índice de Binucleação, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey-Kramer para comparações múltiplas, de modo a se verificar a existência de diferenças significativas entre os diferentes grupos de tratamento e os respectivos controles, a partir das médias e desvios-padrão dos resultados obtidos. Na análise dos dados obtidos através do teste do Micronúcleo, foi realizada uma ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls para comparações entre os dados dos diferentes grupos de tratamento com o controle negativo.

Em todas as análises diferenças ao nível de 5% ($P < 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

Os dados obtidos com a realização do Teste do MTT em culturas de CHO-K1, visando-se identificar a citotoxicidade do extrato da liga Ti-6Al-4V, estão representados nas figuras 12 e 13. Em nenhuma das condições analisadas (24 e 48 horas após os tratamentos) foram detectadas alterações significativas na atividade mitocondrial em relação ao controle negativo, o que permite inferir que nenhuma das concentrações avaliadas do extrato foi capaz de afetar a viabilidade celular.

A Tabela 1 e a Figura 14 reúnem os resultados obtidos a partir da realização do Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese em culturas de células CHO-K1. Após a análise estatística desses resultados, verificou-se que as três concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V avaliadas nesse estudo alteraram significativamente a frequência de células micronucleadas, quando em comparação com o grupo controle negativo ($P=0,01$). Não foram observadas, porém, diferenças significativas nas frequências de células micronucleadas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações do extrato.

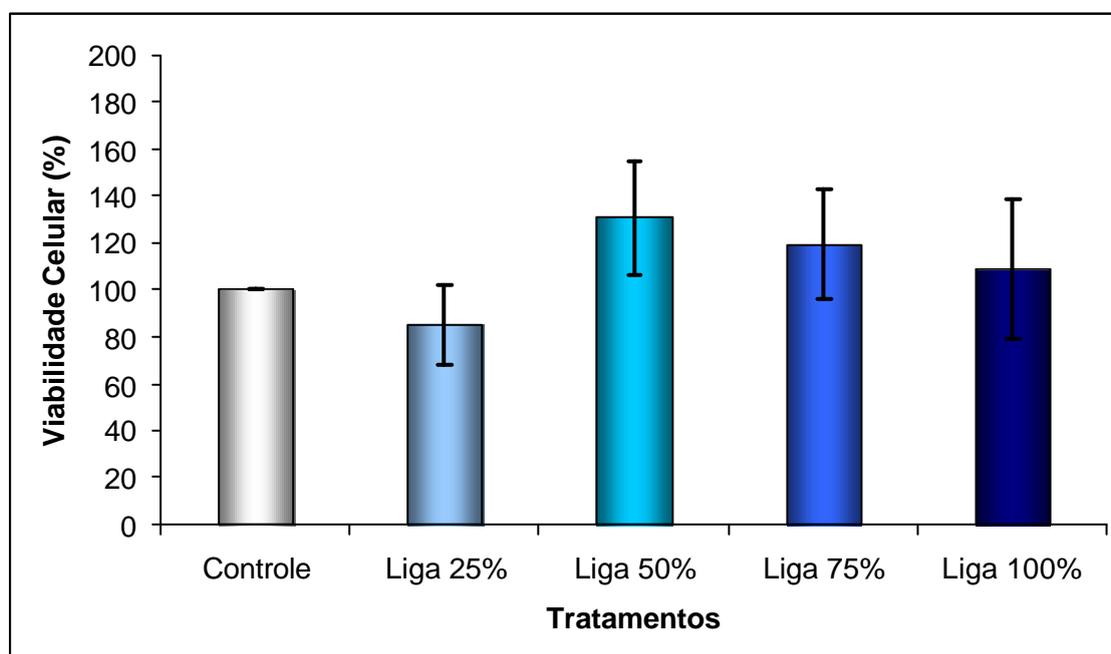


Figura 12: Índice de viabilidade celular obtido através do teste do MTT em culturas de células CHO-K1, 24 horas após o tratamento com diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V. Para o grupo controle, a viabilidade celular é assumida como de 100%.

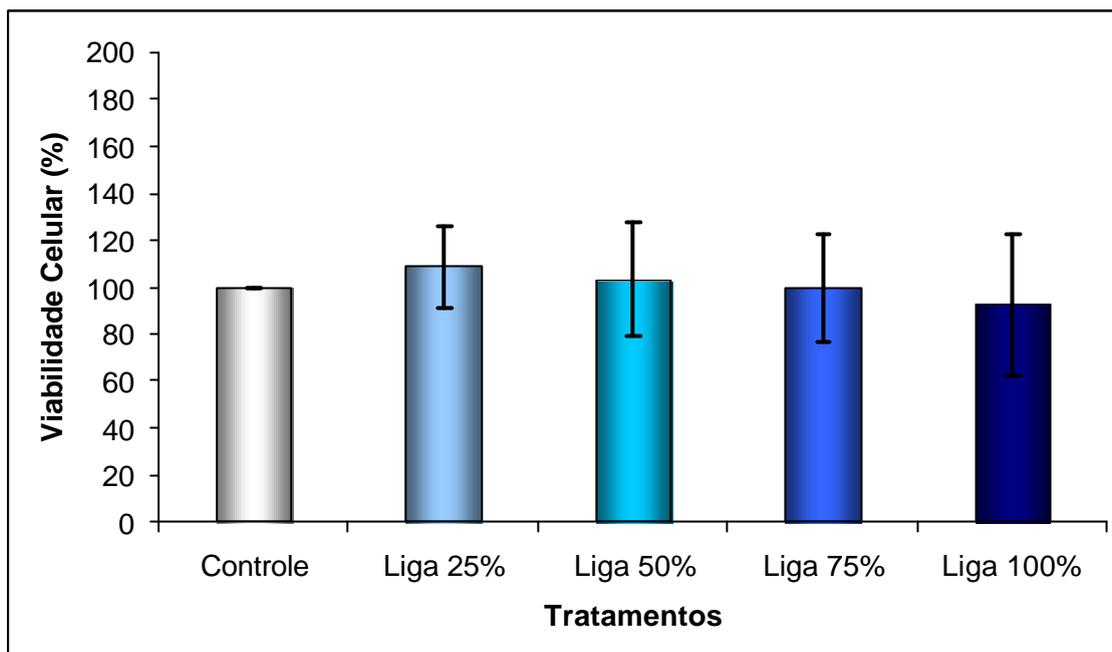


Figura 13: Índice de viabilidade celular obtido através do Teste do MTT em culturas de células CHO-K1, 48 horas após o tratamento com diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V. Para o grupo controle, a viabilidade celular é assumida como de 100%.

Tabela 1: Frequência de células binucleadas e micronucleadas em cada experimento, médias e desvios-padrão, após tratamentos com diferentes concentrações do extrato obtido da liga Ti-6Al-4V em culturas de CHO-K1.

Tratamentos	Experimentos			Média ± SD
	I	II	III	
Controle	11	17	15	14,3 ± 3,06
Mitomicina-C	38	41	39	39,3 ± 1,53*
Extrato				
50%	20	27	25	24,0 ± 3,61*
75%	17	24	25	22,0 ± 4,36*
100%	21	26	26	24,3 ± 2,89*

Nota: SD: Desvio-Padrão; * Valores estatisticamente diferentes do controle negativo (P<0,01)

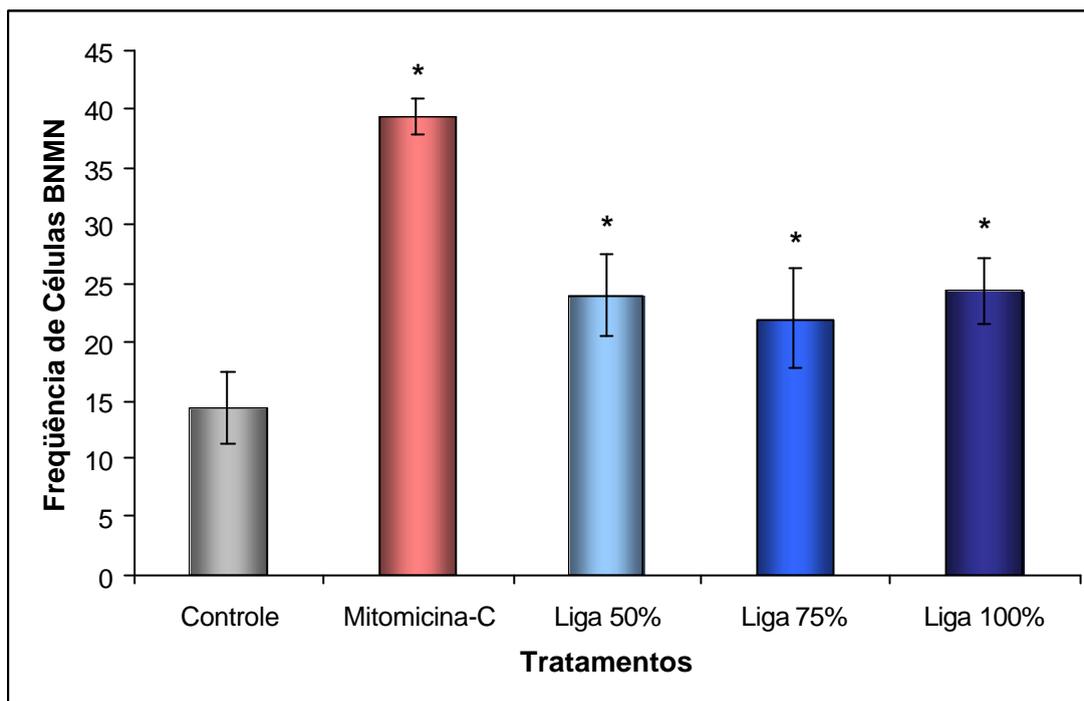


Figura 14: Frequência média de células Binucleadas e Micronucleadas (BNMN) em 1000 células analisadas por grupo de tratamento.

Nota: * Valores estatisticamente diferentes do grupo controle negativo.

A Tabela 2 e a Figura 15 mostram a influência das diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V no processo de origem de células binucleadas. Esses dados demonstram que, para os grupos tratados com as duas maiores concentrações avaliadas (75% e 100%), a frequência média de células binucleadas é significativamente menor do que a observada para o grupo controle negativo.

Tabela 2: Frequência de células binucleadas em 500 células analisadas após tratamento com diferentes concentrações da liga Ti-6Al-4V.

Tratamentos	Experimentos			Média ± SD
	I	II	III	
Controle	64	71	73	69,33 ± 4,73
Mitomicina-C	39	44	47	43,33 ± 4,04*
Extrato				
50%	55	61	63	59,67 ± 4,16
75%	48	54	57	53,00 ± 4,58*
100%	47	46	48	47,00 ± 1,00*

SD: Desvio-Padrão; * Valores estatisticamente diferentes do controle negativo (P<0,01)

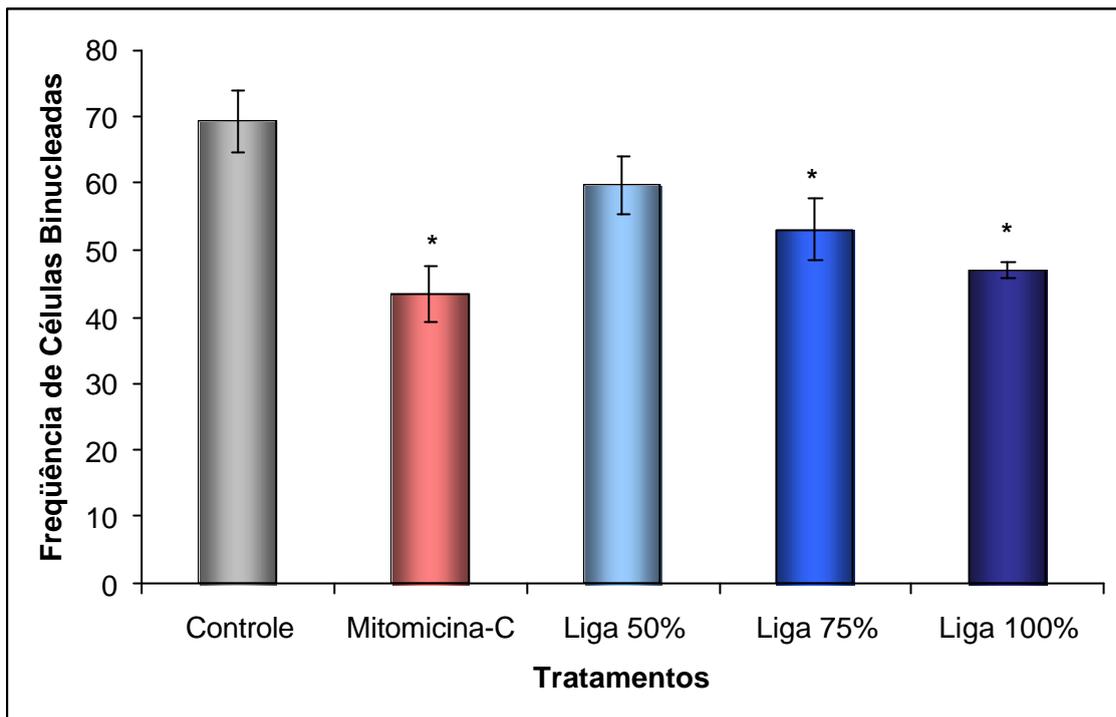


Figura 15: Frequência média de células binucleadas em 500 células CHO-K1 analisadas após tratamento com diferentes concentrações do extrato da liga Ti-6Al-4V.

6 DISCUSSÃO

A cada dia, uma crescente preocupação com relação aos riscos genéticos a que as populações humanas estão submetidas vem se propagando não só nos meios acadêmicos, mas também na sociedade comum. As pessoas estão cada vez mais preocupadas com os riscos inerentes à exposição a determinadas substâncias, estejam elas presentes em nossa dieta, no ambiente, na atmosfera em forma de poluentes, ou em outros aspectos de nossa vida, inclusive aqueles relacionados a tratamentos médicos.

Muitas vezes, substâncias químicas presentes em elementos medicinais podem ser responsáveis pelo surgimento de alterações genéticas e por conseqüências graves advindas dessas alterações. De medicamentos utilizados no tratamento de doenças graves como o câncer até medicamentos tidos como inofensivos, por terem sua origem em plantas medicinais, muitos são os agentes com potencial farmacológico cuja atividade genotóxica e mutagênica é reconhecida pela literatura (69)(70)(71)(72).

Porém, esse problema não está relacionado apenas às substâncias químicas utilizadas como fármacos. Elementos químicos presentes na constituição de implantes médicos, bem como partículas metálicas liberadas dos mesmos, têm sido motivo de preocupação em termos de efeitos nocivos aos pacientes usuários (73). Essa preocupação torna-se evidente quando se verifica a existência de normas rígidas, elaboradas por importantes agências reguladoras internacionais, designando estudos específicos para avaliação dos riscos inerentes ao uso desses materiais.

Dentre os riscos podem ser destacadas reações adversas como respostas inflamatórias, alergias, citotoxicidade e genotoxicidade. Essa colocação encontra respaldo em um recente trabalho de revisão. Para Sargeant e Goswami há uma grande necessidade de se estudar implantes metálicos e os íons liberados pelo material utilizado (74). Concentrações tóxicas de íons podem conduzir a muitos efeitos fisiológicos adversos, conforme supracitado. É importante e necessário, portanto, determinar concentrações de íons que estabeleçam limites entre os níveis normais e tóxicos, o que ainda não foi feito no meio científico.

Estudos têm demonstrado que o contato de biomateriais com fluídos corpóreos pode representar um risco em função da corrosão e conseqüente liberação de elementos potencialmente prejudiciais aos sistemas vivos. Sedarat et al. realizaram um estudo visando a detecção, via espectroscopia de absorção atômica, de íons liberados a partir de peças da liga Ti-6Al-4V numa solução que simulava a composição dos fluídos corpóreos (75). Nesse

estudo, que mediu a concentração dos íons presentes na liga em análises realizadas num período de 96 dias, verificou-se uma constante liberação de Ti e Al durante todo o período de avaliação. O vanádio foi liberado especialmente nos seis primeiros dias de extração, sendo que posteriormente esse elemento quase não foi detectado.

Um estudo *in vivo* realizado por Morais et al. corrobora a idéia de que a liga Ti-6Al-4V tem potencial para liberar íons metálicos quando em contato com fluídos corpóreos. Esse trabalho foi realizado com mini-implantes ortodônticos colocados em coelhos por períodos de 1, 4 e 12 semanas. Após analisar os rins, fígado e pulmões desses animais, foi verificada a presença de concentrações variadas de titânio, alumínio e vanádio. Vale ressaltar, porém, que essas concentrações eram bastante baixas (21).

Comparando a liberação de íons metálicos em diversas ligas (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, Ti-15Zr-4Nb-4Ta, aço inoxidável SUS316L e Ti comercialmente puro) imergidas em uma gama variada de substâncias, Okazaki e Gotoh obtiveram vários resultados. Podemos destacar que a quantidade de íons de Al liberados das ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb tem um decréscimo com um gradual aumento do pH. A quantidade de Ti liberada da liga de Ti-15Zr-4Nb-4Ta foi menor que as quantidades liberadas das ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb em todas as soluções (76).

Em um estudo *in vivo* com tíbias de ratos, Okazaki et al. analisaram as mesmas ligas referidas acima com o objetivo de verificar a liberação de íons metálicos em tecidos vivos. O ensaio teve duração de 48 semanas, e foi encontrada uma pequena quantidade de Ti, Al e V nos tecidos de tíbia com o implante de Ti-6Al-4V. A concentração de Ti nos tecidos de tíbia com o implante de Ti-15Zr-4Nb-4Ta era mais baixa que a dos tecidos de tíbia com o implante de Ti-6Al-4V. A concentração de Al no tecido da tíbia com o implante de Ti-6Al-4V era mais alta que a do tecido de tíbia controle e não aumentou no período de 6 a 48 semanas. A concentração de V aumentou ligeiramente comparada àquela em tecido de tíbia controle. As concentrações de Zr, Nb e Ta também eram muito baixas (23).

Na busca por desenvolver uma liga sem a presença de alumínio e vanádio, estudos de corrosão apontam que a liga Ti-10Mo apresenta valores similares de resistência à corrosão comparada com a liga Ti-6Al-4V (utilizada comumente em implantes e próteses odontológicas), mostrando que essa liga pode ser utilizada em ambiente fisiológico com a vantagem de não possuir elementos que vêm sendo contestados quanto à biocompatibilidade, como o vanádio e o alumínio (77).

Uma maneira de tentar minimizar a liberação de íons por parte da liga Ti-6Al-4V consiste no revestimento da mesma. Estudos de Sousa e Barbosa, revestindo a liga Ti-6Al-4V

com hidroxiapatita, mostraram que depois de 6 meses de imersão em solução salina a 37°C nenhuma quantidade de titânio, alumínio ou vanádio foi detectada na solução através de técnicas espectroscópicas (78). Esses dados indicam que a hidroxiapatita é uma barreira efetiva à liberação de íons metálicos.

No presente trabalho, buscamos avaliar a citotoxicidade e o potencial genotóxico da liga Ti-6Al-4V, amplamente utilizada na confecção de implantes médicos e odontológicos. Apesar da ampla utilização desse biomaterial, a literatura científica é bastante pobre em informações sobre os efeitos biológicos resultantes do contato prolongado com dispositivos constituídos dessa liga metálica.

Um documento elaborado pela *International Standard Organization* (ISO) e adotado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) versa sobre os procedimentos científicos adequados durante os processos de avaliação de biomateriais (79)(80). Esse documento (ISO 10993) designa que o primeiro teste a ser realizado quando se busca a caracterização da biocompatibilidade de um biomaterial é uma avaliação de citotoxicidade. Somente após a obtenção de resultados negativos nessa avaliação é que outros estudos de biocompatibilidade podem ser conduzidos com animais experimentais (81).

Além disso, segundo Chauvel-Lebret et al., a ISO 10993 coloca exigências específicas de acordo com a natureza do contato a ser estabelecido entre o biomaterial e os tecidos do paciente, bem como ao tempo de permanência do mesmo no organismo (82). Assim, de acordo com essa norma internacional, todos os materiais que forem mantidos em contato por um período superior a 30 dias com mucosas, ossos ou tecido dental, bem como todos os dispositivos de implante cujo contato exceda 24 horas deverão ser avaliados quanto à genotoxicidade.

No presente estudo foi realizado um processo de extração baseado nas recomendações da NBR (ISO) 10993-12 (79). A seleção do tempo de seis dias de extração em meio de cultura Ham-F12 sem soro fetal bovino à 37°C e agitação de 90 RPM buscou propiciar uma liberação efetiva dos três componentes presentes na liga Ti-6Al-4V. Os dados obtidos por Sedarat et al. no estudo descrito anteriormente, aliados aos resultados a serem discutidos adiante, reforçam a idéia de que o processo de extração aqui realizado obteve sucesso (75).

Para avaliar a citotoxicidade do extrato da liga Ti-6Al-4V foi utilizado o Teste do MTT, que identifica a conversão do MTT em formazan, num processo que envolve a ação de desidrogenases mitocondriais. Dessa forma, esse ensaio permite inferir, a partir de alterações detectáveis da atividade mitocondrial, se a viabilidade celular foi afetada por um tratamento.

Em nenhuma das condições avaliadas neste estudo o extrato da liga metálica reduziu a viabilidade celular. De acordo com as figuras 12 e 13 pode-se verificar que não existem diferenças significativas entre os valores de viabilidade celular dos grupos tratados com relação aos valores obtidos para o controle negativo.

Nossos dados estão de acordo com o observado por Faria et al., que avaliou a citotoxicidade de diferentes ligas metálicas usadas em implantes dentários, e verificou que a liga Ti-6Al-4V e o Titânio comercialmente puro não foram citotóxicos nas condições por eles implementadas (83). A liga Ti-6Al-4V também foi considerada não citotóxica por Koike et al. em estudos usando o teste do MTT em culturas de fibroblastos (84).

Niinomi, tendo por finalidade estudar a citotoxicidade da liga Ti-29Nb-12Ta-46Zr, fez uma comparação desta com Ti puro e também com a liga Ti-6Al-4V, utilizando o método de MTT em células L-929. Os resultados demonstraram que a liga Ti-29Nb-12Ta-46Zr apresentou citotoxicidade similar ao titânio puro e menor citotoxicidade que a liga Ti-6Al-4V (28).

Long et al. realizaram um estudo com culturas de células da micróglia (BV2) e de neurônios (N27), submetendo-as ao tratamento com TiO₂. De acordo com esse trabalho, nas células BV2 foi verificada uma grande produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e pró-inflamatórios e uma redução do metabolismo energético. Nas culturas de células N27, observou-se um aumento do metabolismo energético e a ativação de caspases pró-apoptóticas, mas não foi detectada citotoxicidade, mesmo 72 horas após a exposição (85).

Em um estudo realizado com o AlCl₃, Prolo et al. demonstraram que o alumínio interfere na proliferação de células humanas *in vitro* e tem uma atividade pró-apoptótica (86). De acordo com Niu et al., a citotoxicidade do alumínio em células neuronais é decorrente de alterações estruturais e funcionais observadas nas mitocôndrias (87). Porém, de acordo com Hussain et al., a citotoxicidade do alumínio foi muito baixa em um estudo empregando uma linhagem de células hepáticas (BRL 3A) (88).

A citotoxicidade do vanádio, presente em diferentes compostos, também tem sido avaliado. De acordo com Soares et al., o vanádio foi capaz de induzir morte celular por necrose em cardiomiócitos, provavelmente em função de alterações na polaridade das membranas mitocondriais (89). Segundo Kordowiak et al., diferentes sais de vanádio mostraram-se citotóxicos e antiproliferativos *in vitro* (90) e, complementarmente, segundo Riley et al., o vanádio foi o mais tóxico de uma série de metais avaliados em culturas de células de epitélio pulmonar (91).

Como podemos verificar, estudos com a liga Ti-6Al-4V demonstram ausência de citotoxicidade enquanto estudos com seus componentes individuais demonstram indução de apoptose, necrose e atividade antiproliferativa. Provavelmente essa diferença observada nos resultados obtidos deve-se não só aos diferentes tipos celulares avaliados, mas, principalmente, às concentrações dos metais às quais as células foram submetidas. Nos estudos com os metais em suas formas isoladas, as concentrações empregadas são, com certeza, muito superiores àquelas obtidas nos processos de extração realizados com a liga metálica.

Entretanto, a literatura tem demonstrado que outras atividades nocivas podem ser apresentadas pelos biomateriais, bem como por seus componentes. Em nossos resultados pôde-se verificar que o extrato da liga Ti-6Al-4V foi capaz de induzir a formação de micronúcleos em todas as concentrações testadas (Tabela 1 e Figura 14). A indução de micronúcleos é bem conhecida como sendo resultado da ação de agentes capazes de proporcionar a ocorrência de quebras cromossômicas (clastogênese) bem como de alterações nas fibras do fuso mitótico, com conseqüente perda de cromossomos inteiros durante a divisão celular (aneugênese).

Como se observa na literatura existe uma preocupação quanto à citotoxicidade das ligas metálicas, mas, no tocante à genética toxicológica, poucos são os trabalhos dedicados a essa área, mesmo porque, não havia uma regulamentação específica para o assunto. Somente em 2003 uma norma específica, ISO 10.993-3, veio contribuir para estipular parâmetros para os testes de genotoxicidade com biomateriais (80).

Um estudo realizado com as ligas Co-Cr-Mo e Ti-6Al para investigar a genotoxicidade através dos testes de Ames e teste em células de Pulmão de Hamster Chinês (V79-HGPRT) revelou resultados negativos para ambas as ligas (92). Vale ressaltar que resultados negativos em bactérias podem apresentar-se positivos em células de mamíferos. Os estudos descritos a seguir revelam resultados positivos quanto à genotoxicidade de ligas metálicas utilizando-se células humanas.

Stea et al. realizaram um estudo com pacientes portadores de implantes metálicos. Nesse estudo foi realizado o teste para avaliação de trocas entre cromátides irmãs (SCE) em linfócitos e verificou-se que os indivíduos portadores de implantes feitos com a liga Ti-6Al-4V apresentaram uma maior frequência de danos genéticos do que o observado nos pacientes com implantes de uma liga Co-Cr e que os indivíduos do grupo controle negativo. A avaliação de troca de cromátides irmãs (SCE) é usada para estabelecer danos citogenéticos, sendo considerado um ensaio bastante sensível e preciso, detectando efeitos danosos de

substâncias químicas mesmo que em baixas concentrações (93). Um outro estudo realizado em células de pacientes portadores de implantes da liga Ti-6Al-4V demonstrou um aumento de aneuploidias nesses indivíduos (94).

Os danos ao material genético citado acima corroboram nossos resultados, uma vez que a origem de MN ocorre em virtude de mutações cromossômicas. Embora sejam testes diferentes dos aplicados no presente trabalho, todos esses procedimentos, de uma forma ou de outra, demonstram o potencial da liga Ti-6Al-4V em ocasionar danos ao DNA.

Estudos realizados por Lu, Ho e Lee em 1998 revelaram que o TiO_2 é capaz de induzir tanto MN quanto troca de cromátides irmãs em culturas de células CHO-K1 (95). O UF- TiO_2 (Óxido de Titânio ultra-fino) induziu MN e apoptose em culturas de células SHE. O número de MN teve um aumento significativo em todas as concentrações entre 0,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A citotoxicidade nessas células foi claramente detectada em uma concentração mais elevada acima de 10,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (96).

Estudos recentes com nanopartículas de TiO_2 revelam sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüentemente causar danos ao DNA (97). Nanopartículas de TiO_2 também foram potencialmente genotóxicas para células de peixes em condições *in vitro*. Esse efeito provavelmente está relacionado à formação de radicais hidroxil ($\bullet\text{OH}$) (98).

Estudos em humanos mostraram que a ingestão de combinações de vanádio pode causar perturbações gastrointestinais. Além disso, combinações de vanádio podem afetar rins e outros órgãos de ratos em doses relativamente baixas. Em doses mais altas, podem causar efeitos adversos e afetar a reprodução e o desenvolvimento de ratos. Esses efeitos ainda não foram demonstrados em humanos, mas não há nenhuma evidência de que não possam vir a ocorrer (99).

No que diz respeito ao vanádio e sua genotoxicidade, num estudo realizado com sais de vanádio (SVO_5 , Na_3VO_4 , NH_4VO_3), os resultados revelaram que todos os compostos testados apresentaram resultados positivos na indução de micronúcleos *in vivo* (100). O óxido de vanádio (V_2O_3), o sulfato de vanádio (SVO_5) e o metavanadato de amônio (NH_4VO_3) induziram trocas de cromátides irmãs (SCE) e aberrações cromossômicas (AC) em experimentos realizados com culturas de células de Ovário de Hamster Chinês (101).

Considerando que o vanádio é um importante poluente ambiental e industrial, Ramírez et al. estudaram a capacidade do mesmo quanto à indução de aneuploidias em linfócitos humanos (102). Para isso utilizaram a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência

(FISH), tendo como foco os cromossomos 1 e 7. Os resultados revelaram alterações cromossômicas numéricas relacionadas à concentração do pentóxido de vanádio (V_2O_5). Os autores concluem que o V_2O_5 pode induzir aneuploidias em linfócitos humano e esse efeito pode estar relacionado às anomalias na função dos microtúbulos e das fibras do fuso mitótico.

A genotoxicidade de quatro compostos de vanádio — metavanadato de sódio ($NaVO_3$), metavanadato de amônio (NH_4VO_3), ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) e sulfato de vanádio (SVO_5) foi avaliada em culturas de linfócitos humanos utilizando diferentes testes citogenéticos para avaliação de danos cromossômicos. Onde não foram observadas alterações nas frequências de aberrações cromossômicas estruturais, porém, foi detectado um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas numéricas e micronúcleos. Esses resultados podem estar relacionados a um possível mecanismo da ação do vanádio, trazendo prejuízos ao fuso mitótico. Para a visualização do centrômero no teste do micronúcleo foi utilizada a técnica de (FISH). Os quatro sais de vanádio mostraram um percentual positivo para presença de centrômero marcado, indicando a presença de cromossomos inteiros na formação dos micronúcleos, confirmando a potencialidade do vanádio em ocasionar aneuploidias (103).

O pentóxido de vanádio (V_2O_5) foi testado para verificar sua possível capacidade em induzir genotoxicidade em seis órgãos diferentes de ratos (fígado, rim, pulmão, baço, coração, e medula óssea) utilizando o teste do cometa. Em todos os tecidos e órgãos avaliados (com exceção da medula óssea), o V_2O_5 aumentou o número de células com danos genéticos. A análise de migração de DNA e a distribuição dos danos mostraram que há diferenças na sensibilidade a este composto entre os diferentes órgãos e tecidos avaliados (104).

Há evidências claras que combinações pentavalentes e tetravalentes de vanádio induzem aneuploidia *in vitro*, devido à interferência com o aparato do fuso. Essas formas, como também vanádio trivalente, podem produzir dano ao DNA *in vitro* e (V_2O_5) *in vivo*, provavelmente devido às espécies reativas de oxigênio. No entanto, os dados disponíveis sugerem que combinações de vanádio não produzem mutações pontuais (gênicas). As evidências de que possa também induzir aberrações cromossômicas são obscuras (99).

Em uma revisão sobre os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos do vanádio, concluiu-se que o vanádio não é clastogênico e apresenta-se como pouco mutagênico. Porém, esse elemento apresenta atividade mitogênica, afetando a distribuição dos cromossomos durante mitose, reforçando a idéia de aneuploidiogênese. Não existem dados indicando que o vanádio seja carcinogênico em animais ou em seres humanos, mas a partir do

momento que o mesmo interfere na mitose e distribuição dos cromossomos, a possibilidade do vanádio ser carcinogênico sob certas condições não pode ser desprezada (105).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) não só são conhecidas por danificar o DNA, mas também por ocasionar danos a outros componentes celulares como proteínas e lipídios. O estudo de lesões ao DNA é importante porque os danos podem ser mutagênicos, e, potencialmente, carcinogênicos. Vários metais estão envolvidos na formação de EROs apresentando diferentes mecanismos de ação (107).

O aumento significativo de células micronucleadas em relação ao controle negativo observado em nossos dados corrobora com a idéia de que os metais podem ocasionar danos oxidativos no DNA. Fica evidente, porém, a necessidade de realização de estudos mais apurados em relação às ligas metálicas para que haja uma melhor compreensão dos mecanismos de danos ao material genético.

O alumínio é conhecido como tóxico, especialmente sua forma trivalente (Al^{+3}) que representa sua forma mais solúvel. A intoxicação por Al está relacionada a algumas desordens patogênicas, principalmente doenças neurodegenerativas como Mal de Parkinson e Mal de Alzheimer (108).

Em estudo para avaliar o potencial mutagênico do cloreto de alumínio ($AlCl_3$) Lima et al., utilizaram o ensaio do Cometa, e análise de aberrações cromossômicas para avaliar os danos ao DNA (108). Várias concentrações foram testadas em linfócitos humanos, todas as concentrações testadas foram citotóxicas e reduziram significativamente o índice mitótico em todas as fases do ciclo celular. Houve também indução de dano ao DNA apresentando clastogênese em todas as fases do ciclo celular, especialmente na fase de S. Também houve indução de poliploidia em tratamentos executados durante a fase de G1. A presença de genotoxicidade e poliploidia na intérfase e mitose, respectivamente, sugerem que o cloreto de alumínio é clastogênico e, indiretamente, afeta a construção dos fusos mitóticos.

Em um trabalho realizado por Lankoff et al. com linfócitos humanos, o alumínio revelou-se um agente com propriedades citotóxicas e genotóxicas, por ser capaz de induzir danos oxidativos ao DNA (109). Nesse mesmo trabalho, verificou-se que a exposição ao alumínio pode causar um atraso no ciclo celular. Também foi detectado que o alumínio inibe o reparo de danos ao DNA induzidos por radiação.

Mediante os resultados obtidos nos experimentos acima quanto à redução do índice mitótico, esses dados corroboram com o presente estudo, uma vez que nos resultados obtidos em relação à quantidade de células binucleadas (Índice de Binucleação) observou-se uma redução nas mesmas à medida que aumentava a concentração do extrato da liga.

Banasik et. al. ao analisarem várias concentrações de $AlCl_3$ pela técnica FISH (para sinalizar o centrômero) observaram que a frequência de MN, aumentada inicialmente, diminuiu a altas concentrações. Essa diminuição na frequência de MN poderia ser explicada por um forte aumento na frequência de apoptoses. Verificou-se também que o $AlCl_3$ induziu MN formados por quebras cromossômicas ou perda de cromossomos inteiros (110).

Vários compostos metálicos [sais de Al (III), Cd (II), Hg (II), Sb (V), Te (VI), e Tl (I)] tiveram a sua capacidade de indução de MN avaliada, utilizando a técnica de FISH e células binucleadas em linfócitos humanos. Como resultado desse experimento, todos os compostos metálicos testados, com exceção do Tl_2SO_4 , mostraram um aumento significativo na indução de MN comparados ao controle. Quanto aos resultados do FISH, houve um aumento na frequência de micronúcleos apresentando cromossomos inteiros, ou seja, com centrômero marcada (C+ MN) para os compostos de Al, Cd, e Hg (111).

O teste de MN em linfócitos de trabalhadores de indústrias que utilizam o alumínio revelou um leve aumento de MN nos mesmos em relação ao controle, porém, não foi significativamente diferente. Entretanto, o teste do cometa utilizando um inibidor de reparo apresentou resultados significativamente diferentes entre os trabalhadores e o grupo controle (112).

Estudos realizados com plantas também revelam danos ao material genético e produção de radicais livres em virtude da presença de alumínio principalmente acumulado nas raízes de arroz conforme demonstrado por Meriga (113). O alumínio também induziu morte celular e danos ao DNA revelados pelo teste cometa em células de *Allium cepa* (114).

Outros metais que não estão presentes na composição da liga avaliada neste trabalho também são alvos de estudos quanto a sua possível genotoxicidade. Goethem, Lison e Kirsch-Volders compararam o potencial genotóxico do cobalto (Co) puro com uma liga contendo cobalto e tungstênio (WC-Co) através do teste cometa e MN utilizando linfócitos humanos. Os resultados indicaram que a liga WC-Co produziu um nível mais alto de dano ao DNA em comparação ao Co puro. Resultados do teste de MN confirmaram essas observações. Ficaram claras que as propriedades clastogênicas do Co aumentam significativamente quando esse metal é misturado ao Tungstênio, sugerindo que as características físico-químicas dessa liga podem agir como um dos importantes parâmetros responsáveis pelo aumento da incidência de cânceres do pulmão observada na população dos trabalhadores envolvidos com esses metais (43).

Um trabalho de revisão sobre o berílio concluiu que não existe um consenso sobre sua genotoxicidade, sugerindo-se que novos ensaios sejam realizados, uma vez que profissionais são expostos a esse metal na fabricação de cerâmica e ligas metálicas (115).

Percebe-se também, que no campo dos biomateriais existe atualmente, uma preocupação não só em estudar os mecanismos de danos ao DNA, possivelmente provocados pelos metais, mas também na compreensão da influência do tamanho das partículas utilizadas nos dispositivos médicos.

Nanopartículas e micropartículas da liga cobalto-cromo foram testadas quanto a sua possível citotoxicidade e genotoxicidade. As nanopartículas causaram mais radicais livres e danos maiores ao DNA em relação às micropartículas, apresentando também maior citotoxicidade. Esses ensaios foram realizados com linfócitos humanos. Assim sendo, deve-se levar em conta o conceito de nanotoxicologia no desenvolvimento de novos dispositivos cirúrgicos (73).

Segundo Brooks et al., verificou-se que quando ocorrem alterações genéticas múltiplas no organismo durante certo período de tempo, certos materiais utilizados como implantes podem originar tumores (116). O presente trabalho de forma alguma tem como objetivo causar polêmicas ou levantar riscos exagerados no uso dos metais em biomateriais. Porém, fica clara a necessidade não apenas da realização de estudos mais profundos, tanto *in vitro* quanto em indivíduos portadores de implantes constituídos de ligas metálicas. Vale ressaltar que nossos resultados são baseados em uma única metodologia e em um único sistema *in vitro*. De acordo com Rahman et al., a indução de micronúcleos é resultado de um dano genético bastante primário e, assim, associar esses eventos diretamente a origem de tumores seria muito precoce e especulativo (96).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados de viabilidade celular obtidos com o teste do MTT, podemos concluir que o extrato da liga Ti-6Al-4V não foi citotóxica para as culturas de células CHO-K1, em nenhuma das condições empregadas no presente estudo. O teste do micronúcleo demonstrou que as três concentrações do extrato avaliadas foram mutagênicas *in vitro*. Dessa forma, podemos concluir que provavelmente íons metálicos presentes no extrato foram capazes de ocasionar quebras cromossômicas e/ou perda de cromossomos inteiros. Verificou-se também que as duas maiores concentrações do extrato (75 e 100%) reduziram o índice de binucleação das culturas de CHO-K1 em relação ao grupo controle negativo. Isso demonstra que os íons provavelmente liberados e presentes no extrato da liga Ti-6Al-4V aqui analisado interferiram no processo de divisão celular mitótico.

Dessa forma, baseados nos resultados obtidos e aqui apresentados, podemos concluir que, de maneira geral, mais estudos *in vitro* e *in vivo* se fazem necessários na área de biomateriais. Assim, após essas avaliações, ter-se-á uma maior segurança no uso prolongado de próteses e implantes metálicos durante longos períodos.

Referências

- (1) MELLO, G.M.R et al. Desenvolvimento de ligas de titânio do tipo β para aplicações em próteses totais de quadril. In: SIMPÓSIO MATÉRIA 2003, 2003, _____. **Anais...** p. 4-8.
- (2) DUCHEYNE, P.; HASTINGS, G.W. **Functional Behavior of orthopedic biomaterials**, Florida: CRC Press, 1984. v.1.
- (3) FONSECA, K. B.; PEREIRA, H.H.; SILVA, S.N. Avaliação de Falhas em Implantes Metálicos Coxo-Femoral e joelho retirados de pacientes. **Revista Matéria**, v. 10, n 3, p. 472 – 480, 2005.
- (4) SILVER, F.; DOILLON, C. **Biocompatibility, Interactions and Implantable Materials**. New York: VCR, 1989.
- (5) CAMPOS, S. D. de et al. Biomateriais à base de Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade. **Cerâmica**, São Paulo, v. 51, n. 319, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-69132005000300016&lng=en&nrm=iso>. doi: <http://10.1590/S0366-69132005000300016>
- (6) LOPEZ, G. D. Biodeterioro y Corrosion de Implantes y Protesis Metálicos. **Medicina** (Buenos Aires), v.53, p.260-274, 1993.
- (7) GREER, R.T; PEARSON, P.T. Biomateriais. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 1ed. São Paulo: Editora Manole, 1998. v.1. p.133-142.
- (8) KAPANEN, A. **Biocompatibility of orthopaedic implants on bone forming cells**. 2002. 63f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Department of Anatomy and Cell Biology, University of Oulu, Finland. 2002.
- (9) RAMIRES, Ivan; GUASTALDI, Antonio Carlos. Estudo do biomaterial Ti-6Al-4V empregando-se técnicas eletroquímicas e XPS. **Quím. Nova** , São Paulo, v. 25, n. 1, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000100003&lng=en&nrm=iso>. doi: <http://www.10.1590/S0100-40422002000100003>
- (10) NIZNICK, G.A. Achieving osseointegration in soft bone: the search for improved results. **Oral Health**, v. 90, p.27-32, 2000.
- (11) VERCIK, L. C. O. et al. Apatites coating "in vitro" on titanium: influence of the thermal treatment. **Eclética. Química**, v.28, n.1, p.25-31, 2003.
- (12) CHOE, H; ABKOWITZ, S.M; ABKOWITZ, S; DUNAND, D.C. Effect of tungsten addition on the mechanical properties of Ti-6Al-4V. **Materials Science and engineering**, v.A396, p.99-106, 2005.

- (13) TADDEI, E. B. et al. Sinterização a Vácuo da Liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 23, n. 2, p. 68-72, 2004.
- (14) ALBUQUERQUE, H; ALBUQUERQUE, P.C.V.C. Artroplastia total do quadril com prótese não cimentada. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 28, n 8, pp589 -596, 1993.
- (15) SERRA, G.G. et al. Mini-implantes Ortodônticos Carregados Imediatamente: Estudo in vivo. **Revista Matéria**, v. 12, n.1 p. 111-119, 2007.
- (16) LI, S. J. et al. Wear characteristics of Ti-Nb-Ta-Zr and Ti-6Al-4V alloys for biomedical applications. **Wear**, v. 257, n.9-10, p. 869-876, 2004.
- (17) SILVA, H. M.; SCHNEIDER, S. G.; MOURA NETO, C. Study of non-toxic aluminium and vanadium - free titanium alloys for biomedical applications. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors And Systems**, v. 24, p. 679-682, 2004.
- (18) ZHANG, X.S. et al. *In vivo* biocompatibility and mechanical study of novel bio-active materials for prosthetic implantation. **J Biomed Mater Res.**, v.46, n.2, p.279-286, 1999.
- (19) DE MAETZU, M.A; ALAVA, JI; GAY-ESCODA, C. Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants. **Clin Oral Implants Res.**, v.14, n.1, p.57-62, 2003.
- (20) MITRI, F.F., et al Histological findings in titanium implants coated with calcium phosphate ceramics installed in rabbit's tibias. **Ann Anat.**, v. 187, p. 93-98, 2005.
- (21) MORAIS, L. S. et. al., Liberação in vivo de íons metálicos por mini-implantes ortodônticos de Ti-6Al-4V. **Revista Matéria**, v. 12, n. 2, pp. 290 – 297, 2007.
- (22) OKAZAKI, Y. et al. Surface analysis of Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy after implantation in rat tibia. **Biomaterials**, v. 22, p. 599-607, 2001.
- (23) OKAZAKI, Y. et al. Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants. **Biomaterials**, v. 25, p. 5913-5920, 2004.
- (24) CAI, Z et al. Electrochemical characterization of cast titanium alloys. **Biomaterials**, v. 24, p. 213-218, 2003.
- (25) ZAFFE, D.; BERTOLDI, C.; CONSOLO, U. Accumulation of aluminium in lamellar bone after implantation of titanium plates, Ti-6Al-4V screws, hydroxyapatite granules. **Biomaterials**, v. 25, p 3837-3844, 2004.
- (26) LIN, D. J. et. al., Bone formation at the surface of low modulus Ti-7.5Mo implants in rabbit femur. **Biomaterials**, v. 28, p 2582-2589, 2007.
- (27) TADDEI, E. B. et al. Ensaio de Citotoxicidade e Influência do Tratamento de Solubilização na Microestrutura da Liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta. **Revista Matéria**, v. 12, n.1, p 120-127, 2007.

- (28) NIINOMI, M. Fatigue performance and cyto-toxicity of low rigidity titanium alloy Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr. **Biomaterials**, v.24, p. 2673-2683, 2003.
- (29) WEVER, D. J. et al. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. **Biomaterials**, v. 18, p.1115-1120, 1997.
- (30) LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- (31) LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M.. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p
- (32) ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.
- (33) DE FLORA, S.; IZZOTTI, A. Mutagenesis and cardiovascular diseases Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. **Mutation Research**, v.62,1 p.5-17, 2007.
- (34) SEO, K.Y.; JELINSKY, S. A.; LOECHLER, E. L. Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens. **Mutation Research**, v. 463, p. 215-246, 2000.
- (35) WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, v.437, p. 105-112, 1999.
- (36) ALBERTS, Bruce et al. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. 757 p.
- (37) ONG, T. et al. Chlorophyllin: A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. **Mutation Research**, v. 173, p. 111-115, 1986.
- (38) HONGPING, D. et al. Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to Vincristine with four genetic tests. **Mutation Research**, v. 599, n.1-2, p.152-159, 2006.
- (39) HOYOS, L. S. et al. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 535-538, 1996.
- (40) LIOI, M. B. et al. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine and dpx-e9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, p. 39-46, 1998.
- (41) MARQUEZ, C. et al. Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2005.
- (42) PEÑA, L. F. M.; MESQUITA, S. F. P.; CÓLUS, I. M. S. Evaluation of the genotoxicity and fetal toxicity of the herbicide Paraquat. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 219-223, 1999.
- (43) GOETHEM, F. V.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for

the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide **Mutation Research**, v.392, p. 31-43, 1997.

- (44) GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 211-220, 1992.
- (45) KURODA, Y., JAIN, A. K., TEZUKA, H. & KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.
- (46) TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (eds) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p. 151-172.
- (47) RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed.). **Teste do Micronúcleo em medula óssea. Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese. Métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.
- (48) PRESTON, R. J., SAN SEBASTIAN, J. R., MCFEE, A. F. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Research** 189:175-183, 1987.
- (49) DIAZ, D. et al. Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v.630, p.1-13, 2007.
- (50) REIFFERSCHIED et al. Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test - Results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. **Mutation Research-Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, v.649, n.1-2,p.15-27,Jan.1 2008.
- (51) MESCHINI et al, DNA repair deficiency and BPDE-induced chromosomal alterations in CHO cells. **Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v.637n.1-2,p.93-1000,Jan.1 2008.
- (52) GALLOWAY, S.M, et al. Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v.312, p 241-261. 1994.
- (53) SLESINSKI, R. S.; GUZZIE, P. J. Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test. In: BALLANTYNE, B. **Perspectives in basic and applied toxicology**. London: John Wrigth, 1988.
- (54) TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.
- (55) MAJER, B. J. et al. Use of the Micronucleus Assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, v. 489, p. 147-172, 2001.
- (56) KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000.

- (57) HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.
- (58) FENECH, M.; MORLEY, A. A. Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. **Mutagenesis**, v 4, p. 98–104, 1989.
- (59) GRAWÉ, J.; BRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ZETTERBERG, G. Low dose effects of chemicals as assessed by the flow cytometric *in vivo* micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 405, p. 199-208, 1998.
- (60) FENECH, M.; MORLEY, A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleous test. **Cytobios**, 43, p.233-246.1985.
- (61) CARTER, S. B. Effects of cytochalasin on mammalian cells. **Nature**, v. 213 p. 261-264, 1967.
- (62) FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v.392, p. 11-18, 1997.
- (63) FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p. 81-95, 2000.
- (64) MILLER, B. et al., Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Research**, v. 392, n.1-2, p. 45-59, 187-208, 1997.
- (65) HAYASHI, M. et al. *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing, and Automated Scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p.234–252, 2000.
- (66) DING, GUI-RONG; NAKAHARA, TAKEHISA; MIYAKOSHI, JUNJI. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. **Mutagenesis**, v. 18, n. 5, p. 439-443, 2003.
- (67) JIANG, J. et al. Silicon-induced DNA damage pathway and its modulation by titanium plasma immersion ion implantation. **Biomaterials** v.29, p.544–550, 2008.
- (68) WANG, T.S.; HUANG, H. Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells **Mutagenesis** v.9, p.253-257, 1994.
- (69) ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75 p.141–164, 2001.
- (70) DAMROT, J. et al. Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide **British Journal of Pharmacology**, v.149, p.988–997,2006.
- (71) KAISEROVA, H. et al. Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p.920–930, 2006.

- (72) SANTOS, F.V. et al. Mutagenicity of Mouriri pusa Gardner and Mouriri elliptica Martius. **Food and Chemical Toxicology**, v.46 p. 2721–2727, 2008.
- (73) PAPAGEORGIU, I. et al. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 28, p 2946–2958, 2007.
- (74) SARGEANT, A.; GOSWAMI, T. Hip implants – Paper VI – Ion concentrations. **Materials and Design**, v.28, p. 155–171, 2007.
- (75) SEDARAT, C. et al. In vitro kinetic evaluation of titanium alloy biodegradation. **J Periodont Res**; v. 36, p. 269-274, 2001.
- (76) OKAZAKI, Y.; GOTOH, E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. **Biomaterials**, v. 26, p.11–21, 2005.
- (77) ENOKIBARA, F., et al. Influência da presença de fluoreto e da variação do ph na resistência à corrosão das ligas TI-6AL-4V E TI-10MO. In: CBECIMat - CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17, 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBCM, 2006.
- (78) SOUSA, S.R.; BARBOSA, M.A. Effect of hydroxyapatite thickness on metal ion release from Ti6Al4V substrates **Biomaterials**, v.17, n. 4, p. 397-404, 1996.
- (79) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (Org.). **Avaliação biológica para produtos de saúde - Parte 12: Preparação de amostras e materiais de referência**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 22 p. (ABNT NBR ISO 10993-12:2005).
- (80) INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity**. Genève: ISO, 2003. (ISO 10993-3:2003).
- (81) ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Carlos, v. 6, n. 3, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392003000300003&lng=en&nrm=iso>. doi: <http://www.10.1590/S1516-14392003000300003>
- (82) CHAUVEL-LEBRET, D. J, et al. Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. **Biomaterials**, v. 22, p. 1795-1801, 2001
- (83) FARIA, A. C. et al. In vitro cytotoxicity of dental alloys and cpTi obtained by casting. **J Biomed Mater Res. B Appl Biomater.**, v.85 p.504-508. 2008.
- (84) KOIKE, M. et al. Initial cytotoxicity of novel titanium alloys. **J Biomed Mater Res. B Appl Biomater**, v.83 p.327-331, 2007.
- (85) LONG, T. C. et al. Nanosize Titanium Dioxide Stimulates Reactive Oxygen Species in Brain Microglia and Damages Neurons in Vitro. **Environmental Health Perspectives**, v.115, p.1631-1637, 2007.

- (86) PROLO, P. *et al.* Aluminium blunts the proliferative response and increases apoptosis of cultured human cells: putative relationship to alzheimer's disease. **Bioinformation**, v.2, p.24-27, 2007.
- (87) NIU, P.Y. *et al.* Aluminum impairs rat neural cell mitochondria in vitro. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v.18, p.683-689, 2005.
- (88) HUSSAIN, S.M. *et al.* In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicol In Vitro**, v.19 p.975-983, 2005.
- (89) SOARES S. S. *et al.* Vanadate induces necrotic death in neonatal rat cardiomyocytes through mitochondrial membrane depolarization. **Chem Res Toxicol**, v.21 p.607-618, 2008.
- (90) KORDOWIAK A.M. *et al.* Comparison of the effect of VOSO₄, Na₃VO₄ and NaVO₃ on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line. **Pol J Pathol.**, v.58 p.51-57, 2007.
- (91) RILEY, M. R. *et al.* Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells. **Toxicology**, v.190 p.171-184, 2003.
- (92) KATZER, A. *et al.* In vitro toxicity and mutagenicity of CoCrMo and Ti6Al wear particles. **Toxicology**, v.190, p. 145-154, 2003.
- (93) STEA, S. *et al.* Sister Chromatid Exchange in Patients with Joint Prostheses. **J Arthroplasty.**, v.15, n.5, p.772-777, 2000.
- (94) DOHERTY, A. T. *et al.* Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip **J. bone jt. sur. Ser. B, Br.**; v. 83-B, n. 7, p. 1075-1081. 2001.
- (95) LU, P.; HO, I.; LEE, T. Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells. **Mutation Research**, v. 414, n.1-3, p.15-20, 1998.
- (96) RAHMAN, Q. *et al.* Evidence That Ultrafine Titanium Dioxide Induces Micronuclei and Apoptosis in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n 8, p.797-800, 2002.
- (97) CHEN, G. *et al.* Electrochemical sensing DNA damage with nano-titanium dioxide and repair with a medicinal herb species reservation **Journal of Biotechnology**, v.127 p.653–656, 2007.
- (98) REEVES, J. F *et al.* Hydroxyl radicals (.OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. **Mutation Research**, v.640, p.113–122, 2008.
- (99) EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. **The EFSA Journal**, v. 33, p.1-22, 2004. (Request N° EFSA-Q-2003-018).

- (100) CIRANNI, R.; ANTONETTI, M.; MIGLIORE, L., Vanadium salts induce cytogenetic effects in in vivo treated mice. **Mutation Research**, v. 343, p.53-60, 1995.
- (101) OWUSU-YAW, J. et al. An assessment of the genotoxicity of vanadium. **Toxicol Lett.**, v.50, p.327-36, 1990.
- (102) RAMÍREZ, P. et al. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. **Mutation Research**, v.386, p.291-298, 1997.
- (103) MIGLIORE, L et al. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. **Mutation Research**, v. 319, p.205-213, 1993.
- (104) ALTAMIRANO-LOZANO M. et al. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.19, p.243-255, 1999.
- (105) LÉONARD, A.; GERBER, G.B. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. **Mutation Research**, v.317, p.81-88, 1994.
- (106) VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.
- (107) CHEN, F.; SHI, X. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. **Oncology Hematology**, v.42, p.105-121, 2002.
- (108) LIMA, P.D. et al. Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Food Chem Toxicol.**, v.45, p.1154-1159, 2007.
- (109) LANKOFF, A. et al. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicol. Lett.**, v.161, p.27-36, 2006.
- (110) BANASIK, A., et al. Aluminium-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. **Environ. Toxicol.**, v.20, p. 402-406, 2005.
- (111) MIGLIORE, L. et al. Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. **Environ. Mol. Mutagen**, v.34, p.279-284, 1999.
- (112) CREBELLI, R et al. Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. **Mutation Research**, v.516, p.63-70, 2002.
- (113) MERIGA, B et al. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **J. Plant Physiol.**, v.161, p.63-68, 2004.

- (114) ACHARY, V. M M et al. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70 p.300–310, 2008.
- (115) GORDON, T.; BOWSER, D Beryllium: genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research**, v.533, p.99–105, 2003.
- (116) BROOKS, R.A. et al. Biological evaluation of carbonfibre-reinforced polybutyleneterphthalate (CFRPBT) employed in a novel acetabular cup. **Biomaterials**, v 25, p. 3429-3438, 2004.