

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

SILVIA HELENA GIERTS

**ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO E ACÚMULO DE PARTÍCULAS
METÁLICAS EM ÓRGÃOS DE RATOS**

**CURITIBA
2008**

SILVIA HELENA GIERTS

**ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO E ACÚMULO DE PARTÍCULAS
METÁLICAS EM ÓRGÃOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Tecnologia
em Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná como requisito
para a obtenção do título de Mestre
em Tecnologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Beatriz Luci Fernandes

**CURITIBA
2008**

Aos meus filhos Victor Hugo e Gabriel, motivos de minha busca infinita pelo crescimento moral, intelectual e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado e concedido discernimento para fazer as escolhas certas até aqui.

À minha família, especialmente meu esposo Daniel, pelo amor, amizade, compreensão, incentivo e dedicação. Sou grata por fazer parte da minha vida, sendo sempre meu refúgio onde encontro paz.

Aos professores, que participaram da comissão examinadora.

Ao Engenheiro Carlos Fernandes, pelo auxílio técnico.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Beatriz Luci Fernandes, pela confiança, incentivo, dedicação e paciência com que me acompanhou durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e ao Laboratório de Patologia da Universidade Positivo, pelo auxílio quanto às técnicas necessárias ao trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Tecnologia em Saúde pelas orientações e prestações de serviços concedidas no decorrer do curso.

Aos profissionais de outras áreas, como Biólogos, Veterinários, Técnicos em Patologia, Engenheiros, que se dedicaram a orientar e ensinar.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

A maioria das próteses, como as de quadril, joelho, ombro, parafusos, pinos e hastes de fixação, é confeccionada em ligas de titânio, ligas de cobalto e em aços inoxidáveis austeníticos. A liberação de partículas metálicas ou íons metálicos a partir de uma endoprótese pode ocorrer devido à corrosão e ao desgaste das peças e alguns estudos associam estas partículas à formação de tumores e à resposta imunológica do organismo, o que tem inspirado estudos epidemiológicos relacionados aos problemas sistêmicos associados com a presença da endoprótese em longo prazo. Apesar do grande interesse na identificação dos efeitos sistêmicos, poucos são os trabalhos realizados com o intuito de descobrir os efeitos colaterais destes metais no organismo humano, o que impede uma conclusão definitiva. Para avaliar os danos causados ao organismo, no entanto, é necessária a identificação da afinidade de alguns íons metálicos com determinados órgãos. O objetivo deste trabalho foi identificar lesões nos tecidos de fígado, rim, pulmão e coração de ratos nos quais foram injetadas soluções contendo partículas das ligas utilizadas na fabricação de próteses: Ti6Al4V, CoCrMo e Aço Inoxidável 316L. As partículas metálicas foram fabricadas por atrito dos metais em dispositivo especialmente desenvolvido e foram injetadas nos ratos utilizando-se solução de Hank como veículo. Foram estudados 40 ratos, divididos em grupos de 10, um grupo para cada liga e um grupo controle no qual foi injetada a solução de Hank sem partículas. Os ratos ficaram em observação durante 35 dias, quando tiveram os tecidos dos órgãos, após a eutanásia, isolados, preparados e analisados em microscópio ótico e em EDS para detecção de partículas metálicas. Foram encontradas lesões como granulomas epitelioides de corpo estranho e células gigantes no tecido do coração de um rato pertencente ao grupo do Ti6Al4V, no tecido do fígado e do pulmão do grupo da liga CoCrMo, nos tecidos do fígado, do coração e do pulmão do grupo do aço inox 316L e no tecido do fígado do grupo controle. Por meio da análise em EDS foi identificado o ítrio, um componente do aço inox, no fígado de um dos ratos deste grupo e de alumínio no coração de um dos ratos pertencentes ao grupo da liga Ti6Al4V, indicando a liberação de íons destas ligas e seu transporte pela corrente sanguínea. Pode-se concluir que existem evidências de contaminação de órgãos por elementos químicos pertencentes às ligas Ti6Al4V e aço inox 316L. Nenhuma contaminação foi identificada com a injeção das partículas da liga CoCrMo. A lesão identificada no fígado de um dos ratos do grupo controle pode ser atribuída à injeção da solução de Hank no peritônio, região onde se encontra este órgão. Os resultados deste trabalho mostram a importância de um estudo aprofundado dos efeitos sistêmicos advindos da utilização de próteses metálicas.

Palavras-chaves: Biomateriais, Implantes Metálicos, Ti6Al4V, CrCoMo, Aço Inox 316L.

ABSTRACT

The majority of the prosthesis like those for hip, knee, shoulder, screws, bolts and stems, is produced with Ti alloys, Co alloys and austenitic stainless steel. The release of metallic particles or metallic ions from an endoprosthesis can occur due to corrosion and wear of its components and some studies have been associating these particles to the formation of tumors and to the body immune response, which have inspired epidemiologic studies related to the systemic effects associated to the presence, in long term, of an endoprosthesis. Despite considerable interest in identifying systemic effects, few works are carried through intended to discover the collateral effects of these metals in the human body, what not allow a definitive conclusion. In order to evaluate the damages to the organism, however, it is necessary the identification of the affinity of the metallic ions with specific organs. The objective of this work was to identified lesions in tissues of liver, kidney, lung and heart of rats in which had been injected solutions composed by particles of the alloys used on the prosthesis fabrication: Ti6Al4V, CoCrMo and Stainless steel 316L. The particles were fabricated by friction of the metals using an especially developed device and were injected into the rats using Hank's solution as vehicle. It was studied 40 rats, divided in groups of 10, one group for each alloy and one control group in which it was injected Hank's solution without particles. The rats were maintained in observation during 35 days, when the tissues of the organs, after euthanasia, were isolated, prepared and analyzed in optical microscope and by EDS for detection of metallic particles. It were found lesions like strange body epithelioid granuloma and giant cells in the heart tissue of a rat belonged to the Ti6Al4V alloy, in the liver and lung tissues of the CoCrMo group and in the liver, heart and lung tissues of the stainless steel 316L group and in the liver tissue of the control group. Through the EDS analysis it was identified yttrium, a component of the stainless steel, in the liver of a rat from this group and aluminum in the heart of a rat belonged to the Ti6Al4V group, indicating the ion release process of these alloys and its transportation through the blood stream. It can be concluded that there is evidences of organs contamination by chemical elements constituents of the Ti6Al4V and stainless steel alloys. No contamination was identified with the CoCrMo particles. The lesion found in the liver of a rat from the control group can be attributed to the Hank's solution injection in the peritoneum, region where the liver is located. The results of this work show the importance of a deeper study of the systemic effects occasioned by the use of metallic prosthesis.

Keywords: Biomaterials, Metallic Implants, Ti6Al4V, CrCoMo, stainless steel 316L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama de Pourbaix para o ferro:	8
Figura 2: Diagrama simplificado de potencial e pH para o sistema Fe-H ₂ O.	9
Figura 3: (a) Micrografia de implante subcutâneo onde se observa a lacuna central de onde foi retirado o implante, circundada por tecido cicatricial cutâneo, (b) micrografia de implante circundado por tecido reacional composto por fibroblastos, macrófagos e fagocitose de resíduos do implante.....	10
Figura 4: (a) Radiografia das hastes mostrando uma região de corrosão excessiva (setas), (b) metalose no tecido ao redor das hastes, (c) haste com tecidos aderidos e pontos de corrosão.....	12
Figura 5: (a) Cabeça de fêmur de alumina com adesão de partícula de titânio proveniente do acetábulo, (b) micrografia eletrônica de varredura da partícula de titânio depositada.	13
Figura 6: Aspecto de células gigantes multinucleadas.....	13
Figura 7: Granuloma epitelióide (células alongadas) ao redor de uma célula gigante.....	14
Figura 8: (a) Peça inferior e superior em liga Ti6Al4V, (b) peça superior e inferior em aço inoxidável 316L e (c) peça superior e inferior em liga CoCrMo. As formas foram usinadas aproveitando as dimensões das peças como fornecidas.	18
Figura 9: Dispositivo para a produção de partículas metálicas.....	19
Figura 10: Dispositivo mostrando os encaixes na cuba interna para fixação das peças em atrito..	20
Figura 11: (a) Processo de filtração das partículas metálicas utilizando um funil de Büchner e (b) partículas retidas no papel de filtro.	21
Figura 12: (a) Pesagem da cobaia anestesiada, (b) solução de Hank contendo as partículas metálicas, (c) injeção no peritônio da cobaia.	23
Figura 13: Órgãos dissecados de um dos animais. (a) pulmão, (b) fígado, (c) coração e (d) rins.....	24
Figura 14: Órgãos imersos em formalina para conservação até a preparação das amostras para a análise histopatológica.....	24
Figura 15: Posicionamento do tecido em cassete para a preparação para a análise histológica.....	25
Figura 16: Aparência dos tecidos após a impregnação com parafina.	26
Figura 17: (a) Posicionamento do tecido para o processo de inclusão e (b) bloco de parafina com o tecido incluído.	26
Figura 18: (a) Micrótomo com o bloco de parafina posicionado e (b) corte do bloco de parafina.....	27

Figura 19: Procedimento de pescagem das fitas cortadas em micrótomo, colocadas em banho-maria para distensão.	27
Figura 20 Seqüência utilizada para a coloração das lâminas.....	28
Figura 21: (a) Partículas de Ti6Al4V, (b) partículas de aço inox 316L e (c) partículas de CoCrMo, observadas em MEV.	32
Figura 22 (a) Amostra de tecido do coração de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Ti6Al4V com a identificação do granuloma epitelióide, 40x, (b) amplificação do granuloma tipo corpo estranho, mostrando o acúmulo de macrófagos ao seu redor.	34
Figura 23: (a) e (b) Amostra de tecido do fígado de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Inox 316L com a identificação de dois pequenos granulomas epitelióides, 40x.	34
Figura 24: Amostra de tecido do coração de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Inox 316L com a identificação granuloma epitelióide tipo corpo estranho com agrupamento de fagócitos e com material não digerido em seu interior, 1000x.	35
Figura 25: Amostra de tecido do pulmão de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Inox 316L com a identificação de (a) pneumonia grave em organização, (b) células gigantes e (c) granuloma epitelióide tipo corpo estranho, 40x, 400x e 40x.....	35
Figura 26: (a) Amostra de tecido do fígado de rato que sofreu injeção de partículas da liga CoCrMo com a identificação de granuloma epitelióide e (b) amostra de tecido do pulmão de rato que sofreu injeção de partículas da liga CoCrMo com a identificação de granuloma epitelióide e células gigantes, 40x e 1000x.....	36
Figura 27: Amostra de tecido do fígado de um rato que sofreu injeção de solução de Hank, sem partículas metálicas, pertencente ao grupo controle. Observa-se um pequeno granuloma epitelióide, 1000x.	36
Figura 28: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado de rato (cortical) que sofreu injeção de solução de Hank livre de partículas metálicas.....	38
Figura 29: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.	39
Figura 30: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.	40
Figura 31: Diagrama da análise química por EDS para tecido do coração cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de Ti6Al4V.	41
Figura 32: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo.....	42
Figura 33: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo.....	43

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações Clínicas de Biomateriais.....	3
Tabela 2: Ligas metálicas e suas composições químicas.	17
Tabela 3: Dimensões das peças metálicas utilizadas para a produção das partículas.	18
Tabela 4: Tempo para obtenção das partículas das ligas metálicas.	21
Tabela 5: Massas das peças metálicas.....	33
Tabela 6: Massa de partículas metálicas e tempo para obtenção.	33
Tabela 7: Resumo dos resultados encontrados, em ratos distintos, com a análise histológica.	37
Tabela 8: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado de rato que sofreu injeção de solução de Hank livre de partículas metálicas.....	38
Tabela 9: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.....	39
Tabela 10: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.....	40
Tabela 11: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do coração cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de Ti6Al4V.	41
Tabela 12: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo.....	42
Tabela 13: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM: American Society for Testing Materials

Atm: atmosfera

CoCrMo: Cobalto-Cromo-Molibdênio

E: Eletrodo

EDS: Espectroscopia em Energia Dispersiva em raio-X

HBSS: Solução Salina Balanceada de Hank

IL-2: Interleucina 2

MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura

NaCl: Cloreto de Sódio

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

Ti6Al4V: Titânio-Alumínio-Vanádio

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VI
LISTAS DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVO GERAL	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. BIOMATERIAIS	3
2.2. PARTÍCULAS LIBERADAS DE PRÓTESES E IMPLANTES METÁLICOS	5
2.3. CORROSÃO METÁLICA	7
2.4. CORROSÃO EM PRÓTESES.....	10
2.5. ÍONS METÁLICOS LIBERADOS PELAS LIGAS Ti6AL4V, CoCrMo E AÇO INOX 316L	14
3. METODOLOGIA	17
3.1. PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS METÁLICAS.....	17
3.2. ENSAIO IN VITRO	21
3.3. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS	25
3.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	29
3.5. PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	29
4. RESULTADOS.....	32
4.1. PRODUÇÃO DAS PARTICULAS METÁLICAS.....	32
4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	33
4.3. ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA	37
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	47
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A – LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	54
APÊNDICE A – QUADRO CONTENDO AS MASSAS DOS RATOS ANTES DO PROCEDIMENTO DE INJEÇÃO	55

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos implantes, como próteses de quadril, joelho, ombro, parafusos, pinos e hastes de fixação, é confeccionada em ligas metálicas de Ti, de CoCr e em aços austeníticos. A liberação de partículas metálicas a partir de uma endoprótese pode ocorrer devido à corrosão e ao desgaste das peças e alguns estudos associam estas partículas à formação de tumores e à resposta imunológica do organismo (KREIBICH *et al.*, 1996).

Pesquisas vêm sendo realizadas sobre as propriedades carcinogênicas dos metais utilizados em endopróteses articulares. Cobalto e cromo, por exemplo, são considerados indutores de carcinoma e alta concentração destes metais tem sido encontrada nos tecidos vizinhos ao implante (THARANI *et al.*, 2001).

Alguns íons metálicos solúveis, como Co, Cr, Ni e Mo, são citotóxicos e produzem tumores malignos em cobaias e pacientes com implantes totais em articulações apresentam maior susceptibilidade ao câncer quando comparados com uma população genérica (DORAN *et al.*, 1998).

Estes resultados têm inspirado estudos epidemiológicos relacionados aos problemas sistêmicos associados com a presença da endoprótese em longo prazo, pois a tendência é o desenvolvimento de implantes com resistência suficiente para suportar 30 anos ou mais sem falhas (THARANI *et al.*, 2001).

Após a inserção do implante, o meio biológico reage quimicamente com a superfície do metal e o pH da região se altera, deixando o meio biológico ácido. A deterioração causada pela interação físico-química entre o material e o seu meio leva a alterações do material, como desgaste e modificações na estrutura, tornando-o inadequado para o uso (GENTIL, 2003). Portanto, mesmo considerados resistentes à corrosão, os metais sofrem, em algum grau, o ataque químico do organismo, cujo meio é extremamente agressivo e dinâmico.

Apesar do grande interesse na identificação dos efeitos sistêmicos causados pela presença, em longo prazo, de um material metálico no organismo, poucos são os trabalhos realizados com o intuito de descobrir os efeitos colaterais destes metais no organismo humano, o que impede uma conclusão definitiva. Para avaliar os

danos causados ao organismo, no entanto, é necessária a identificação da afinidade dos íons metálicos com determinados órgãos.

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é identificar íons metálicos em tecidos de órgãos de ratos, provenientes da injeção de partículas das ligas Cobalto-Cromo-Molibdênio (CoCrMo), aço inoxidável 316L e Titânio-Alumínio-Vanádio (Ti6Al4V), nestes animais.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) Identificação, por meio de análises histopatológicas, das alterações (como granulomas, carcinomas, necroses e acúmulo de íons metálicos) nos tecidos de fígado, rins, pulmões e coração de ratos que sofreram injeção das partículas metálicas no peritônio;
- b) Identificação dos elementos químicos presentes nos tecidos extraídos dos órgãos dos ratos, através de EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BIOMATERIAIS

Wise (2000) definiu biomaterial como toda substância, exceto alimentos ou drogas, introduzidas nos sistemas de diagnóstico ou terapêuticos, que entram em contato com os tecidos ou fluidos biológicos. Constituem um grupo de materiais naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos. São inseridos ou colocados sobre o corpo com o objetivo de melhorar a função ou substituir o tecido doente, danificado ou perdido ou ainda todo um órgão.

O grande desafio na utilização dos biomateriais artificiais é a substituição dos tecidos vivos de forma a mimetizar as suas propriedades físicas, assim como a sua capacidade de crescimento, reparo e regeneração. Os biomateriais artificiais podem ser metálicos, poliméricos, cerâmicos, vítreos e compósitos. Dependendo do tipo de aplicação, utiliza-se um único tipo de material ou uma combinação dos materiais (ORÉFICE, 2006; KAWACHI *et al.*, 2000).

A Tabela 1 mostra algumas aplicações clínicas dos biomateriais.

Tabela 1: Aplicações Clínicas de Biomateriais

Biomaterial	Aplicações
Metais e ligas (aço inoxidável, ligas de titânio, ligas de cobalto-cromo)	Fixações ortopédicas (parafusos, fios, pinos, placas, hastes), implantes dentários
Compósitos (fibra de carbono-resina termofixa, fibra de carbono-termoplástico), carbono-carbono, fosfato de cálcio-colágeno	Válvula cardíaca artificial, implantes de joelho
Polímeros (polietileno), PFTE (Politetrafluoretileno), poliéster, poliuretano, PMMA (polimetilmetacrilato), sílica	Suturas, artérias, veias, maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente)
Cerâmicas e vidros (alumina, zircônia, carbono, fosfatos de cálcio, porcelana, vidros bioativos)	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos, traqueias artificiais

FONTE: Kawachi et al., 2000; Oréfice, 2006.

Os biomateriais utilizados em implantes são selecionados com base nas suas propriedades mecânicas, estabilidade química e biocompatibilidade. No entanto, a

durabilidade e a eficácia clínica dos dispositivos biomédicos implantáveis permanecem limitadas, em parte, devido à falta de uma adequada interação biológica na interface do implante com a falta de integração nos tecidos adjacentes (MEYERS *et al.*, 2008).

Biocompatibilidade descreve as interações entre o sistema vivo e os materiais introduzidos neste sistema. Um material é bioinerte quando a interface do material-tecido é estável, ou seja, os constituintes dos tecidos e dos materiais não reagem quimicamente uns com os outros, nem dissolvem entre si. Quando a interface não está em equilíbrio, isto é, quando a interface é instável, a relação entre o material e hospedeiro é caracterizada por irritação, inflamação, reação imune, pirogenicidade, toxicidade, carcinogenicidade ou mutagenicidade. Os biomateriais que não podem ser eliminados pelo organismo são tolerados quando são encapsulados com tecido fibroso e são bioativos quando evocam uma reação crítica generalizada (WISE, 2000).

Materiais metálicos desempenham um papel essencial como biomaterial no reparo ou substituição de grandes defeitos em tecido ósseo. Os metais são mais adequados para aplicações onde existe solicitação mecânica, devido à sua combinação de elevada resistência mecânica, resistência à corrosão, à fadiga e à sua tenacidade à fratura. Os biomateriais metálicos mais utilizados incluem os aços inoxidáveis, as ligas de titânio e as ligas de cobalto. Um grave problema associado a esses biomateriais é a liberação de íons metálicos quando em contato com os fluidos biológicos, por meio do processo de corrosão ou desgaste, o que encadeia processos inflamatórios, reduzindo a biocompatibilidade e causando a perda tecidual da região ou osteólise, quando em contato com tecido ósseo (OKAZAKI, 2004).

Estudos realizados por Okazaki (2004) mostram a liberação de íons cromo, cobalto e níquel, por meio da detecção de altas concentrações nos fluidos corpóreos de pacientes com próteses de quadril metal-metal. Íons vanádio também foram detectados, liberados pela liga Ti6Al4V. Outros estudos realizados por Fleury *et al.* (2006) demonstraram que a liga CoCrMo tem um efeito citotóxico nos osteoblastos, podendo levar à toxicidade celular, hipersensibilidade ao metal e alterações cromossômicas.

Os materiais metálicos são usados, geralmente, como ligas e aplicados, principalmente, na fabricação de próteses artificiais de quadril, joelho, ombro,

cotovelo e pulso, na função de reconstrução de articulações artríticas ou fraturadas. Os mais comuns são os aços inoxidáveis austeníticos, titânio puro e ligado com Al, V e Nb e ligas de cobalto com a CoCrMoNi (RYAN, 2005; OKAZAKI, 2004).

A resistência à corrosão é um dos aspectos-chave da biocompatibilidade dos metais e depende da formação de um filme passivo bastante aderente sobre a sua superfície (ÓREFICE, 2006). Alguns tratamentos superficiais podem ser realizados sobre os biomateriais metálicos com a intenção de facilitar a integração com os tecidos vivos, no entanto, não impedem a corrosão em longo prazo (WISE, 2000).

2.2. PARTÍCULAS LIBERADAS DE PRÓTESES E IMPLANTES METÁLICOS

A implantação de materiais metálicos é realizada com a intenção de restaurar estruturas danificadas no corpo humano em regiões onde uma boa resistência mecânica é importante, como no tecido ósseo. Estas endopróteses ou implantes podem ser utilizados em longo ou curto prazo (FONSECA *et al.*, 2005).

Após o implante de um material no tecido ósseo, ocorrem as primeiras reações químicas entre a superfície do implante e os tecidos vizinhos. Essas reações são reguladas pelos fluidos teciduais. Sobre a superfície do implante é formada uma camada de macromoléculas glicoproteicas e água, que são determinantes para a adesão, a proliferação, a diferenciação e a síntese protéica de células osteoblásticas (DINATO, 2001; KALBACOVA *et al.*, 2007).

Paralelamente, tem início uma série de reações bioquímicas que são desencadeadas começando com a alteração do pH na região do implante seguido pela liberação de proteínas e enzimas reguladoras do processo de divisão e diferenciação celular. Em uma segunda etapa, ocorre a formação de um tecido granuloso na região entre o osso e o implante para a reparação do tecido e a deposição de colágeno e, conseqüentemente, ocorre a formação de uma matriz fibrosa ou matriz óssea primária. A esta matriz primária agregam-se magnésio, cálcio, sódio, fosfato e outros compostos que, em conjunto, são responsáveis pela maturação estrutural do tecido. Na terceira etapa do processo de osseointegração, ocorre o remodelamento ósseo sobre a superfície do implante (DINATO, 2001; KALBACOVA *et al.*, 2007).

A maior causa de falhas nos implantes metálicos está relacionada às osteólises. Partículas metálicas liberadas pelo desgaste e corrosão das próteses na região ao redor do implante induzem as reações inflamatórias dos tecidos, podendo causar anormalidades e alterações nos tecidos e até mesmo a falha total do implante. Análises *pos mortem* de pacientes portadores de próteses de quadril mostraram partículas metálicas de desgaste no fígado e no baço e em 38% dos pacientes foram detectadas partículas nos linfonodos (REVELL *et al.*, 1996; URBAN *et al.*, 2000; CASE *et al.*, 1994).

Em relação às próteses fabricadas em ligas CoCr, Jacobs *et al.* (2004) encontraram altos níveis de cobalto e de cromo no sangue e cromo na urina de um paciente que apresentou falha em sua prótese articular metálica.

Boardman *et al.* (2006), após análises histológicas de tecidos retirados de pacientes com revisão de artroplastia de quadril, observaram infiltração linfocítica densa com áreas de necrose e presença de partículas de cobalto e de cromo no soro. A disseminação de partículas metálicas para órgãos distantes da região de implantação da prótese pode afetar o fígado, o baço e os linfonodos por meio de uma resposta macrofágica imediata. Em algumas das análises realizadas, foram encontradas granulomatoses significantes formadas no fígado e no baço, com necrose, afetando os linfonodos. A massa formada pareceu ter se desenvolvido por um mecanismo imunológico, acionado devido às partículas metálicas nanométricas, o qual produziu agregações linfocíticas densas.

Além das implicações sistêmicas devido à migração das partículas, constatou-se que a presença de íons metálicos provenientes de ligas de CoCr em células humanas mostra favorecimento do processo de reabsorção óssea (REVELL *et al.*, 1996).

O estudo de caso clínico de um paciente de 61 anos de idade portador de prótese de titânio, realizado por Urban *et al.* (1996), concluiu, após biópsia do fígado, a presença de hepatite granulosa contendo partículas negras no centro do granuloma, identificadas como partículas metálicas.

Heffernan *et al.* (2007), após revisão de artroplastia de quadril em um paciente do sexo masculino, 63 anos de idade, encontraram características de metalose, após 16 anos de implantação. Notou-se significativa osteólise ao redor dos parafusos de fixação. O acúmulo de partículas metálicas nos tecidos ao redor do implante causou um processo inflamatório crônico. Essas partículas também foram

transportadas até os linfonodos próximos e distantes do processo inflamatório, causando necroses e alterações fibróticas.

Estudos realizados em ratos sobre a toxicidade do níquel contido em próteses articulares mostraram, por meio de análises químicas e histológicas, a presença de níquel no fígado, no baço e nos rins dos animais (PEREIRA *et al* 1995).

Tomizawa (2006) realizou estudos em seres humanos com implantes de fios de aço inoxidável 316L removidos após 10 anos de implantação. Os fios foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e com difração de raio-X. Foram encontrados, no tecido ao redor do implante, elementos como cálcio, ferro, cromo, níquel e manganês. Os fios de aço inoxidável apresentaram pontos de corrosão com conseqüente liberação de partículas metálicas nos organismos estudados.

2.3. CORROSÃO METÁLICA

O processo de corrosão de uma prótese pode ter início logo após a implantação. Corrosão é definida como a deterioração de um material metálico, por ação química ou eletroquímica do meio ambiente, aliada ou não a esforços mecânicos, alterando e modificando o material na sua estrutura, tornando-o inadequado para uso (GENTIL, 2003).

A corrosão metálica está associada à exposição do metal a um meio condutor onde exista água, gás oxigênio, ou íons de hidrogênio.

Atualmente, afrouxamento asséptico é a causa mais comum de falha de implantes ortopédicos. A polarização catódica da liga Ti6Al4V induz um aumento do nível intracelular de espécies reativas de oxigênio e também a alteração do metabolismo das células (KALBACOVA *et al.* 2007).

O aço inox, embora resistente a vários meios corrosivos, sofre corrosão localizada em presença do íon cloreto, existente nos fluídos biológicos. O cobre e suas ligas sofrem corrosão em presença de soluções contendo amoníaco e em presença de ácido nítrico. O titânio sofre corrosão em ácido fluorídrico, embora seja resistente a outros meios ácidos (GENTIL, 2003).

A imersão de um metal em solução eletrolítica estabelece uma diferença de potencial entre a interface metal-solução e o sistema (solução e metal), evoluindo espontaneamente para o estado de equilíbrio, ou seja, diferença de potencial nulo. Se dois metais diferentes estiverem imersos em uma solução e ligados por um fio condutor, haverá passagem espontânea de elétrons por meio do condutor formando, desta forma, uma pilha eletroquímica (GENTIL, 2003).

Pourbaix (1963) desenvolveu um método gráfico, relacionando potencial e pH, que possibilita a previsão das condições nas quais pode ocorrer corrosão, imunidade ou possibilidade de passivação de um determinado metal ou liga.

No diagrama de Pourbaix são representadas as possíveis reações, a 25°C e 1 atm, entre os metais e a água, e valores normais de pH e de potencial de eletrodo (E). São apresentados vários equilíbrios químicos e eletroquímicos que podem existir entre o metal e o eletrólito líquido (GENTIL, 2003).

A Figura 1 mostra o diagrama de equilíbrios eletroquímicos E-pH em relação ao ferro em presença de soluções aquosas diluídas em 25°C e 1 atm.

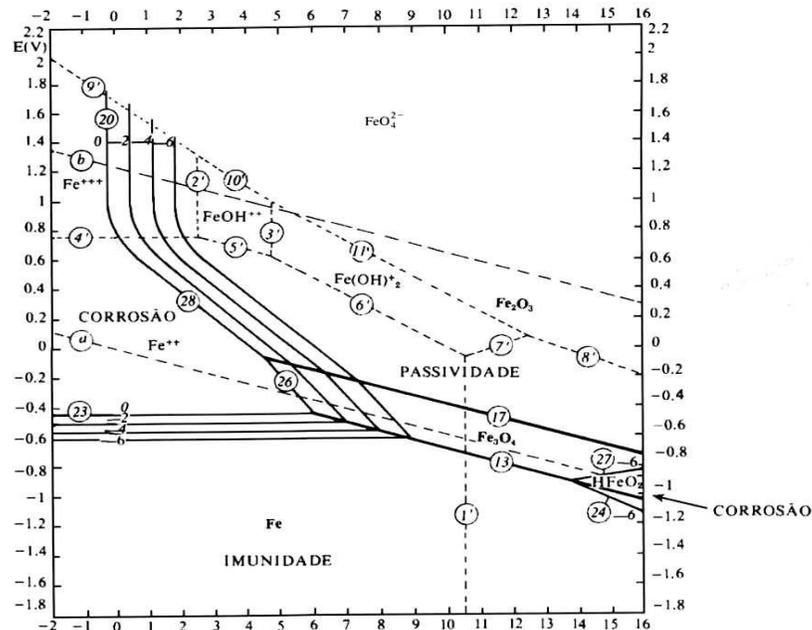


Figura 1: Diagrama de Pourbaix para o ferro: equilíbrio potencial-pH para o sistema Fe-H₂O a 25°C. Quanto mais ácido o meio, mais corrosão ocorrerá com o ferro. Em um meio onde a acidez é baixa, como num meio neutro como água deionizada, ocorrerá passivação, isto é, o ferro não sofrerá corrosão (GENTIL, 2003).

As linhas horizontais do diagrama correspondem às reações que só dependem do potencial (EH) e as linhas verticais correspondem às reações dependentes do pH. As linhas inclinadas correspondem às reações que dependem do pH e do potencial.

Na Figura 1, as linhas inclinadas e paralelas *a* e *b* representam condições de equilíbrio das reações eletroquímicas, entre *a* e *b* é o domínio de estabilidade da água. Abaixo da linha *a* (pH_2), a água tende a se decompor por redução, gerando H_2 . Acima da linha *b* (pO_2), a água tende a se decompor por oxidação, gerando O_2 .

As linhas 1', 2', 3' e 4' representam os limites de predominância relativa dos corpos dissolvidos. Abaixo delas, os íons ferrosos Fe^{2+} predominam e acima os íons férricos Fe^{3+} predominam.

As linhas 13 e 17 separam os domínios de estabilidade relativa dos corpos sólidos mencionados. As linhas 20, 23, 28 e 26 representam as condições de equilíbrio entre corpos sólidos e corpos dissolvidos.

O diagrama potencial-pH, representado na Figura 2, define as regiões onde o ferro está dissolvido sob forma de íons e as regiões onde o metal é estável na forma de fase sólida, como um metal puro ou um dos seus óxidos. Se o pH e o potencial de eletrodo na interface metal/solução correspondente aos íons ferro estáveis, o ferro se dissolverá, até que a solução fique equilibrada, como indica o diagrama a seguir.

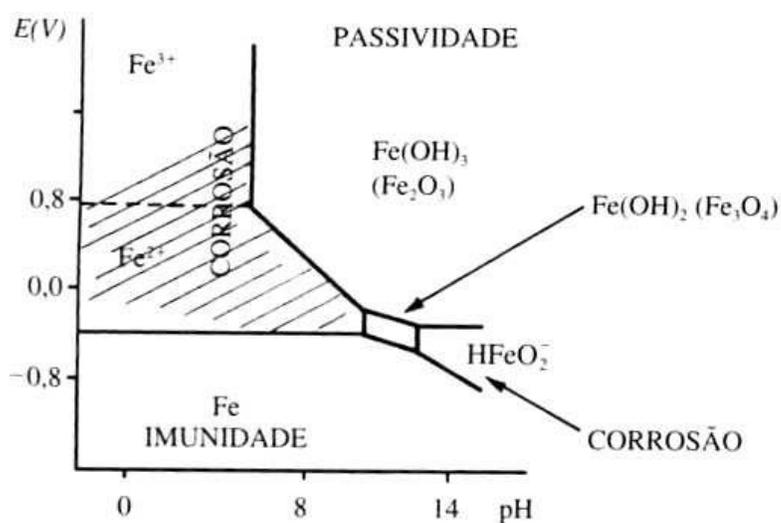


Figura 2: Diagrama simplificado de potencial e pH para o sistema Fe-H₂O, mostrando as regiões onde ocorre, de acordo com o potencial, E, e o pH: passividade, corrosão e imunidade do Fe (GENTIL, 2003).

A dissolução é a corrosão do metal. Em regiões onde o metal é estável (na região inferior do diagrama), não ocorrerá corrosão. Em região que corresponde à estabilidade de um óxido, sendo este aderente à superfície do metal, ocorrerá a formação de uma barreira contra a ação corrosiva da solução, chamada de filme passivo.

2.4. CORROSÃO EM PRÓTESES

A presença de um biomaterial no organismo induz um processo inflamatório. Para reduzir a gravidade deste processo, é necessário o desenvolvimento de técnicas de implantação menos traumáticas e biomateriais mais compatíveis com o sistema biológico (ORÉFICE, 2006).

O processo inflamatório consiste de um conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos sucessivos bastante complexo que tem, como objetivo, minimizar, neutralizar, destruir e eliminar as causas da agressão, além de induzir a reparação do tecido (regeneração e cicatrização) (ORÉFICE, 2006).

As propriedades físicas e químicas dos biomateriais e a topografia e forma do material na interface com o tecido vivo influenciará o tipo, a intensidade e a duração da resposta inflamatória (ORÉFICE, 2006).

O tecido granuloso (macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados), mostrado na Figura 3a, e células gigantes, mostradas na Figura 3b, compõe as reações que ocorrem quando o organismo reconhece, no implante, um corpo estranho.

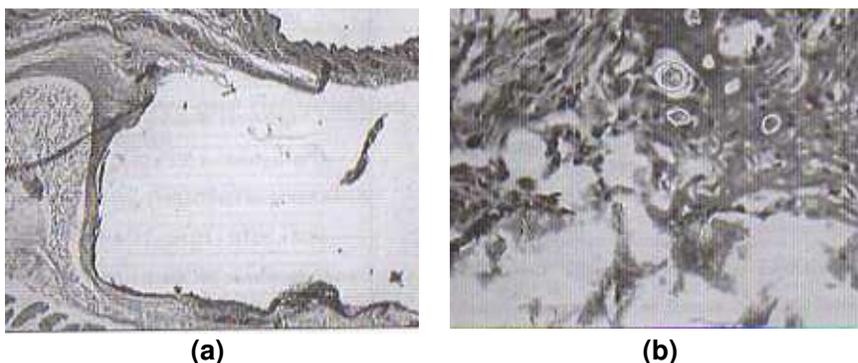


Figura 3: (a) Micrografia de implante subcutâneo onde se observa a lacuna central de onde foi retirado o implante, circundada por tecido cicatricial cutâneo, (b) micrografia de implante (região mais clara) circundado por tecido reacional composto por fibroblastos, macrófagos e fagocitose de resíduos do implante (ORÉFICE, 2006).

Se o material for inerte, a resposta inflamatória será mínima, geralmente, formando uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso ao redor da prótese (ORÉFICE, 2006).

A liberação de íons metálicos ocorre devido à dissolução, desgaste ou, principalmente, à corrosão da liga. Portanto, a resistência à corrosão é importante na análise da biocompatibilidade (MORAIS *et al.*, 2007).

Os íons liberados pelo processo de corrosão têm a capacidade de interagir com os tecidos por meio de diferentes mecanismos. As reações biológicas acontecem pela interação do íon liberado com moléculas do hospedeiro e depende da composição da liga. Os efeitos causados no organismo são devidos às influências dos íons sobre os mecanismos de adesão bacteriana, de toxicidade, de efeitos subtóxicos ou de alergias aos íons metálicos liberados. A toxicidade das ligas depende do processo de fabricação das próteses, do pré-tratamento do material, das condições da superfície e das fases presentes nas ligas. As reações subtóxicas têm influência na síntese dos produtos celulares envolvidos na reação inflamatória, como, por exemplo, as ligas à base de cobre induzem os linfócitos a produzirem elevados níveis de IL-2 (interleucinas, células T antígenos específicos). As alergias podem ser efeitos das reações adversas a metais, como níquel, ouro, cobalto, cromo, etc. (MORAIS *et al.*, 2007).

Alguns dos íons liberados pelo desgaste e pela corrosão permanecem concentrados nas regiões vizinhas à prótese e outros são levados pelos vasos sanguíneos ou linfáticos, células e fluidos celulares, para tecidos distantes, como cérebro, pele, trato gastrintestinal, baço, fígado e rins (WOODMAN *et al.*, 1984). Além disso, a corrosão pode levar à falha mecânica do implante (DEL RIO *et al.*, 2007).

Tem-se sugerido que as partículas metálicas concentradas ao redor da prótese sejam a causa da osteólise, pois estimulam os macrófagos a liberar mediadores químicos, tais como as citocinas, as quais induzem à reabsorção óssea (ITO *et al.*, 2004).

Íons de titânio liberados por implantes bucais, por exemplo, podem ser encontrados no fígado, linfonodos, tecidos moles sobre o implante, rins e pulmões. No cérebro e nos rins podem ser detectados íons titânio, vanádio e alumínio. No entanto, parece existir uma preferência dos íons de titânio pelos pulmões (FINET *et al.*, 2000; LUGOWSKI *et al.*, 1991; SCHLIEPHAKE *et al.*, 1993).

Apesar de as ligas de Ti6Al4V terem excelentes propriedades mecânicas para uso em prótese de quadril, a liberação de íons metálicos provenientes delas pode causar efeitos carcinogênicos locais e sistêmicos. O titânio e o alumínio podem afetar a função celular, proliferação celular e a síntese da matriz extracelular. Os íons de titânio, alumínio e vanádio podem inibir a formação de apatita, dificultando a mineralização na interface com o tecido ósseo e deposição de alumínio no cérebro tem sido associada a desordens neurológicas (BROWNE & GREGSON, 2000).

As cirurgias de revisão são efetuadas após 10 a 15 anos da primeira cirurgia (implantação). Durante este período, a detecção dos níveis de metais no organismo do paciente pode ser feita por exames de sangue e urina. Altos níveis de metais no sangue e na urina foram encontrados em pacientes submetidos à revisão de próteses, indicando corrosão das mesmas (ITO *et al.*, 2004).

As Figuras 4a, 4b e 4c mostram um caso grave de metalose (concentração de partículas metálicas) ao redor da haste de um implante retirado, causada pelo excessivo processo de corrosão (DEL RIO *et al.*, 2007).

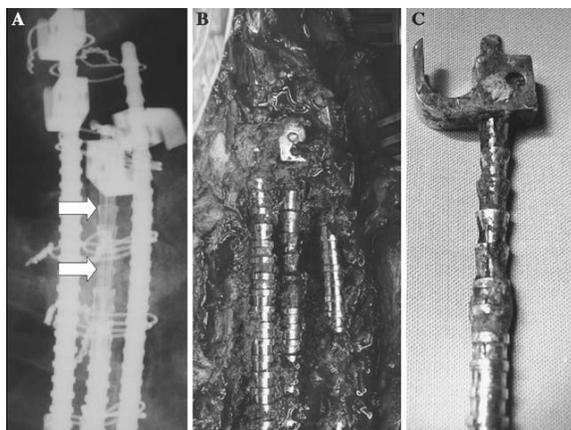


Figura 4: (a) Radiografia das hastes mostrando uma região de corrosão excessiva (setas), (b) metalose no tecido ao redor das hastes (setas), (c) haste com tecidos aderidos e pontos de corrosão.

As Figuras 5a e 5b mostram um processo de adesão de partícula metálica em uma cabeça de fêmur cerâmica (MULLER *et al.*, 2006).

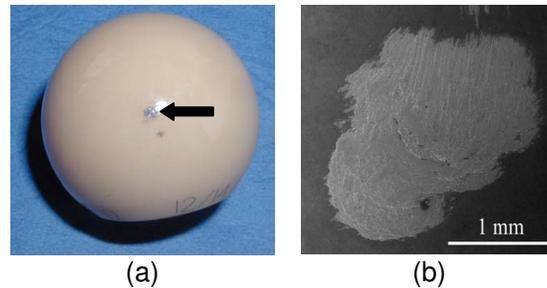


Figura 5: (a) Cabeça de fêmur de alumina com adesão de partícula de titânio proveniente do acetábulo (seta), (b) micrografia eletrônica de varredura da partícula de titânio depositada (MULLER *et al.*, 2006).

A formação de granulomas faz parte de um processo inflamatório de defesa imunológica do organismo. Células gigantes e macrófagos definem o estágio final de uma reação a corpo estranho que começa a partir da inserção de um biomaterial (ANDERSON *et al.*, 2008)

Granulomas são compostos fundamentalmente por macrófagos ou pela fusão destas células, chamadas células gigantes ou multinucleadas. Estas células são hiperplásicas, apresentam-se em grande quantidade e são restritas a um local. São avasculares em seu volume, apresentando vascularização somente na sua periferia. Na sua constituição existem muitos Linfócitos e poucos granulócitos (GUIDUGLI-NETO, 1997). O aspecto das células gigantes provenientes de uma reação inflamatória está apresentado na Figura 6.

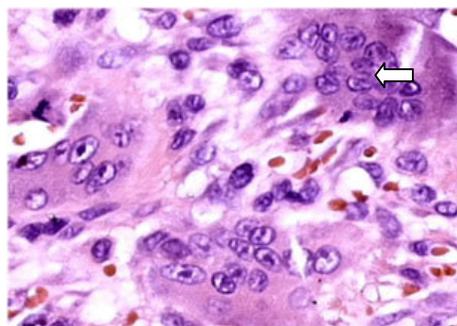


Figura 6: Aspecto de células gigantes multinucleadas (seta) (ISRAEL *et al.*, 2009).

O granuloma epitelióide é identificado por meio da formação, do tipo e tamanho das células. O principal constituinte dos granulomas são as células epitelióides formadas de macrófagos alterados, com seu volume aumentado, núcleos alongados e cromatina frouxa, lembrando um fibroblasto. As células

epitelioides estão unidas umas às outras no granuloma, lembrando um epitélio, sendo estas partes obrigatórias dos granulomas (GUIDUGLI-NETO, 1997). A Figura 7 mostra a aparência de granuloma epitelióide ao redor de uma célula gigante.

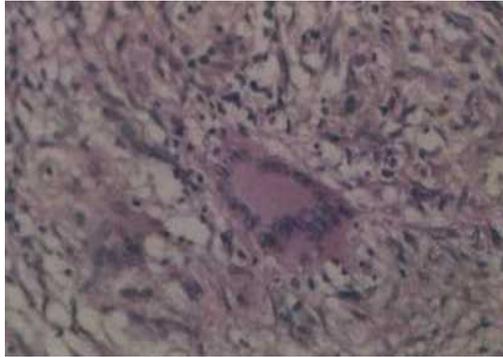


Figura 7: Granuloma epitelióide (células alongadas) ao redor de uma célula gigante (Atlas de microscopia, 2009).

2.5. ÍONS METÁLICOS LIBERADOS PELAS LIGAS Ti6AL4V, CoCrMo E AÇO INOX 316L

A camada de óxidos formada na superfície dos metais desempenha um papel importante como inibidor da liberação de íons no organismo. Porém quando o implante é inserido, uma grande área superficial fica em contato com os fluidos orgânicos resultando em um processo inflamatório, com uma diminuição do pH local, o que leva à corrosão do metal e à liberação de íons metálicos (OLMEDO *et al.*, 2008).

Além disso, qualquer rompimento do filme óxido, que pode ocorrer durante o procedimento cirúrgico de inserção do implante, favorece a corrosão aumentando, portanto, a liberação de íons. Alguns elementos metálicos são preferencialmente liberados durante o processo de corrosão e o seu comportamento dentro do organismo depende de afinidades eletroquímicas. Alguns íons metálicos combinam com moléculas de água ou com algum ânion próximo à região de sua liberação,

formando óxidos, hidróxidos ou sais orgânicos de forma a não apresentarem toxicidade. Os íons que causam reações inflamatórias e, portanto, são citotóxicos, são aqueles que combinam com biomoléculas (HANAWA, 2004).

A liga Ti6Al4V forma uma camada superficial de óxidos, na sua maioria constituída de TiO_2 que, apesar de não mostrar efeitos tóxicos visíveis em modelos animais, acumulam-se em rins, fígado, pulmões e pâncreas. Apesar do seu comprometimento com o oxigênio, íons Ti podem reagir com biomoléculas e provocar reações adversas nos tecidos (HANAWA, 2004). Os íons alumínio na forma Al^{3+} são reconhecidos como neurotóxicos em humanos e em animais. Ocorre uma retenção prolongada de Al que entra no cérebro carregado pelo fluxo sanguíneo o que tem sido relacionado com doenças neurológicas como Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, embora ainda não devidamente comprovado (YOKEL, 2000). Os íons vanádio nas formas V^{4+} e V^{5+} podem formar produtos tóxicos no organismo. Os íons vanádio, quando combinados com outros íons que fazem parte dos fluídos corpóreos, formam sais, como o NaVO_3 , que possuem efeitos similares à insulina no organismo humano, funcionando como antidiabético. No entanto, estudos em animais têm demonstrado efeitos tóxicos dos sais inorgânicos e óxidos formados pelo vanádio em fígado e rins (SRIVASTAVA, 2000).

Na liga CoCrMo existe também a formação de uma camada de óxido que caracteriza a sua resistência à corrosão. Quando o metal é exposto a um meio agressivo como o organismo, no entanto, a liberação de íons metálicos pode ocorrer. O molibdênio geralmente ocorre como Mo(VI) que reage com o oxigênio formando MoO_4^{2-} , o qual é absorvido no trato intestinal. Quando não está ligado à vitamina B12, o cobalto existe no sistema biológico como íon Co^{2+} e seu excesso estimula o aumento das células vermelhas afetando o funcionamento da glândula

tireóide (HELMUT, 1986). O íon cromo, na forma hexavalente, Cr(VI), mesmo quando combinado com elementos dos fluídos corpóreos formando sais, é reconhecidamente um agente cancerígeno em pulmões, considerado o seu órgão alvo (WISE *et al.*, 2002).

Quando imerso em solução de Hank em presença de proteínas como o fibrina, globulina e albumina, o aço inoxidável libera maiores quantidades de íons ferro, níquel e cromo, quando comparado à imersão na solução sem as proteínas. Este comportamento pode ser explicado pela formação de complexos entre os íons metálicos e as proteínas os quais, no organismo, podem ser transportados para regiões distantes do local de inserção do implante. A formação do complexo causa um desequilíbrio químico na superfície do metal que libera mais íons metálicos e, conseqüentemente, sofre corrosão ocasionando um processo contínuo de liberação de íons e formação de complexos (VIRTANEN *et al.*, 2008).

No aço inoxidável 316L, em cuja composição química encontra-se em maior quantidade os elementos ferro, cromo e níquel, a superfície do filme é composta de oxido de ferro e cromo, contendo uma pequena quantidade de molibdênio (KAMACHI, 2000; MUDALI *et al.*, 2003). Em ambientes ácidos com alta concentração de íons cloreto, como o orgânico, a camada de óxido é destruída expondo o metal ao meio com conseqüente liberação de íons metálicos (DIAS & CANDIDO, 2008). O ferro é absorvido na forma de Fe(II) e é oxidado, no sangue, para a forma Fe(III), o qual forma precipitados altamente insolúveis transportados no sangue pela proteína transferrina. O níquel, no organismo, encontra-se na forma iônica Ni^{2+} que não é considerado tóxico. No entanto, quando combinado com gás carbônico forma moléculas $Ni(CO)_4$ que são facilmente absorvidos pelos pulmões e são altamente tóxicos (HELMUT, 1986).

3. METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho é dividida em seis etapas: produção das partículas metálicas, ensaio *in vivo*, preparação das lâminas para as análises histológicas em microscópio ótico, análise histológica, preparação das lâminas para a análise com EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva).

3.1. PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS METÁLICAS

Os materiais metálicos utilizados e suas composições químicas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Ligas metálicas e suas composições químicas.

Liga metálica	Composição
Ti6Al4V	(0,05% Nitrogênio), (0,10% Carbono), (0,012% Hidrogênio), (0,30% Ferro), (0,20% Oxigênio), (6,0% Alumínio), (4,0% Vanádio)
CoCrMo	0,35% Carbono), (ba 1 Cobalto), (26-30% Cromo), (0,7-1,5% Ferro), (1,0% Manganês), (5-7% Molibdênio), (0,25% Nitrogênio), (1,0% Níquel), (1,0% Silício)
Inox 316L	0,08% Carbono), (2,0% Manganês), (0,02% Fósforo), (0,01% Enxofre), (1,0% Silício), (17,0-19,0% Cromo), (13,0-15,50% Níquel), (2,0-3,0% Molibdênio), (0,10% Nitrogênio), (0,5% Cobre)

FONTE: ASTM F75-01, ASTM F1108-04, ASTM F138-00.

Para a produção das partículas, com base no trabalho de Yang *et al.* (1998), foram utilizadas tarugos de Ti6Al4V e de aço inox 316L que foram atritados contra peças do mesmo material e peças de CoCrMo que foram esmerilhadas. As dimensões das peças estão especificadas na Tabela 3 e as Figuras 8a, 8b e 8c mostram as peças.

Tabela 3: Dimensões das peças metálicas utilizadas para a produção das partículas.

Liga	Peça superior	Peça inferior
Ti6Al4V	Diâmetro menor = 9 mm Diâmetro maior = 19 mm Comp. = 58 mm	Diâmetro menor = 13 mm Diâmetro maior = 18 mm Comp. = 50 mm
CoCrMo	Diâmetro = 7 mm Comp. = 35 mm Não possui diâmetro menor	Diâmetro = 50 mm Comp. = 7 mm
Aço 316L	Diâmetro menor = 7 mm Diâmetro maior = 22 mm Comp. = 42 mm	Diâmetro menor = 16 mm Diâmetro maior = 27 mm Comp. = 46 mm

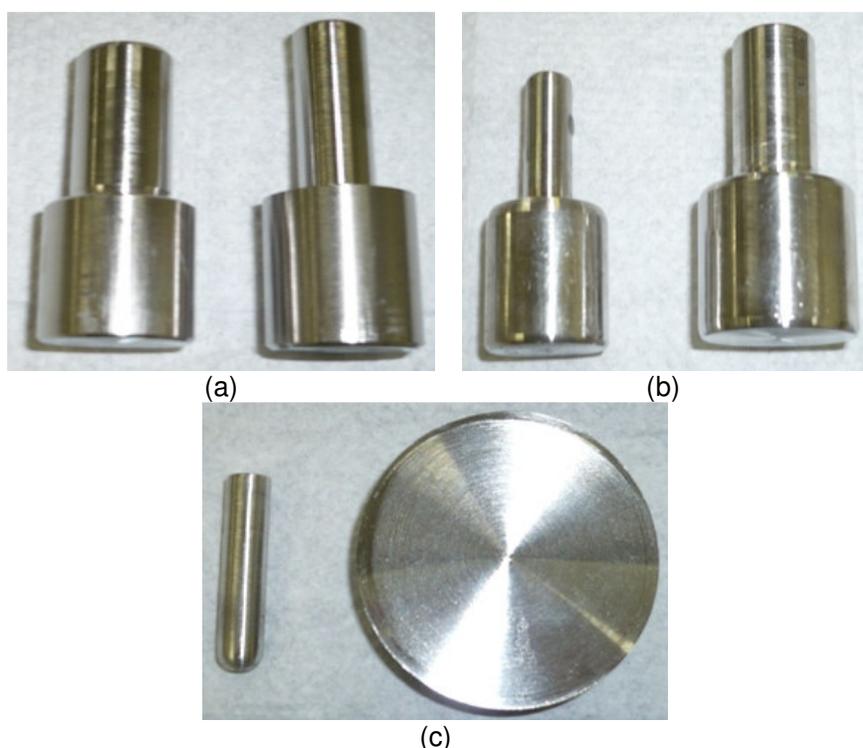


Figura 8: (a) Peça inferior (esquerda) e superior (direita) em liga Ti6Al4V, (b) peça superior (esquerda) e inferior (direita) em aço inoxidável 316L e (c) peça superior (esquerda) e inferior (direita) em liga CoCrMo. As formas foram usinadas aproveitando as dimensões das peças como fornecidas.

Foi projetado e construído um dispositivo para a produção das partículas em aço inoxidável 304, contendo uma cuba interna e uma externa. A cuba interna reteve as partículas imersas em uma solução de água deionizada suplementada com 5 $\mu\text{g/ml}$ de Dispacilina 400 mg, a fim de evitar contaminação por organismos que pudessem afetar a saúde dos ratos utilizados para o ensaio *in vivo*. A cuba externa, contendo água e gelo, foi construída com a intenção de manter a solução da cuba interna e as peças em atrito sob refrigeração, à temperatura ambiente em média de

20°C, evitando a proliferação de bactérias. A Figura 9 mostra o dispositivo esse dispositivo.



Figura 9: Dispositivo para a produção de partículas metálicas mostrando a furadeira elétrica adaptada em um suporte que permite o seu deslizamento, a cuba externa contendo água e gelo e a cuba interna contendo a solução onde as superfícies em atrito permaneceram imersas.

Para a produção das partículas, as peças metálicas superiores foram fixadas no mandril de uma furadeira e as peças inferiores foram fixadas em um sistema especialmente desenvolvido para evitar a sua rotação durante a fricção, como mostra a Figura 10. A região das peças em atrito foi mantida imersa na solução durante todo o período de funcionamento da furadeira.

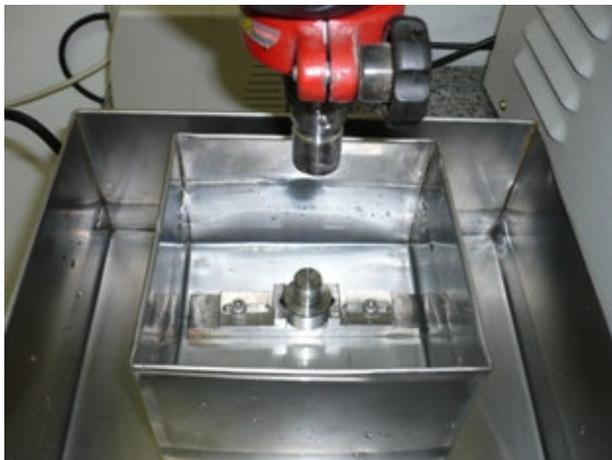


Figura 10: Dispositivo mostrando os encaixes na cuba interna para fixação das peças em atrito. Peça inferior (cuba) e peça superior (mandril da furadeira elétrica) em aço inox 316L.

As peças foram pressionadas entre si utilizando o peso da furadeira e um peso excedente de $\frac{1}{2}$ kg, e atritadas em velocidade constante de 300 rpm. As peças em CoCrMo não produziram partículas com este procedimento, mesmo após 8 horas de atrito. A alternativa encontrada foi a fabricação das partículas com o auxílio de um esmeril. As peças foram pesadas em uma balança Marte, modelo AS2000C ($\pm 0,02$ g), antes e depois de atritadas.

A fim de preservar o motor da furadeira, esta foi deixada em descanso durante 15 minutos a cada hora de funcionamento. Depois de produzidas as partículas, visualizadas no fundo da cuba, a solução foi filtrada com o auxílio de um funil de Büchner com papel de filtro de 28μ , como ilustrado nas Figuras 10a e 11b. O papel de filtro contendo as partículas foi secado em estufa e as partículas foram pesadas.

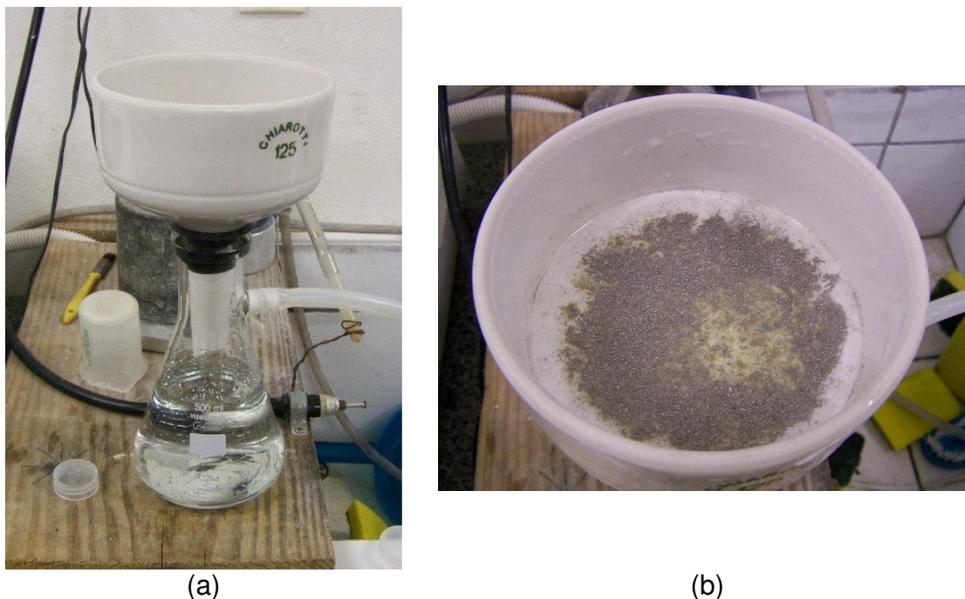


Figura 11: (a) Processo de filtração das partículas metálicas utilizando um funil de Büchner e (b) partículas retidas no papel de filtro.

O tempo necessário para a obtenção de uma quantidade visível de partículas, mostrado na Tabela 4, dependeu da dureza de cada liga. O curto tempo para a fabricação das partículas da liga CoCrMo em relação às demais foi devido à utilização de esmeril como descrito anteriormente.

Tabela 4: Tempo para obtenção das partículas das ligas metálicas.

Liga metálica	Tempo para obtenção (h)
Ti6Al4V	8
CoCrMo	1/4
Aço inox 316L	4

Uma amostra das partículas de cada liga foi analisada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca Jeol, modelo JSM-6360LV para a verificação das formas e tamanhos.

3.2. ENSAIO *IN VITRO*

O procedimento para o ensaio *in vivo* foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR (protocolo n. 186), o qual se encontra no Anexo A.

Foram adquiridos 45 ratos machos, da raça Wistar, com tempo de vida acima de 40 dias e com massa aproximada de 250 g, sendo dez ratos para cada liga metálica e para o grupo controle e cinco ratos de reserva, seguindo as diretrizes da norma técnica ASTM 750-87(2002).

As partículas metálicas produzidas foram esterilizadas em autoclave a 120°C durante 20 minutos para eliminar quaisquer contaminantes. Em seguida, as partículas foram misturadas em HBSS (Solução Salina Balanceada de Hank).

A solução preparada para a injeção foi baseada no trabalho de Rae, (1975), Pereira *et al.* (1995) e na norma técnica ASTM 750-87(2002), os quais determinam a proporção de 0,5 mg de partículas para 2 ml de solução. A dose utilizada foi de 50 ml/kg, de uma suspensão na concentração de 0,37%, injetada em uma taxa máxima de 0,1 ml/s. Para o cálculo da quantidade de material injetado, considerou-se uma massa de 300 g para cada rato. Dessa forma, considerando-se 50 ml para cada kg, tem-se o valor de 15 ml de solução injetada em cada rato. Considerando ainda, 0,5 mg de partículas em 2 ml de solução, chega-se ao valor de 3,75 mg de partículas em 15 ml de solução injetado em cada rato. No entanto, 15 ml é uma quantidade muito alta para ser injetada em cada rato (risco de óbito), portanto, optou-se por concentrar a solução com 3,75 mg de partículas em 1 ml de solução, valor este aceitável para os tamanhos das cobaias. As massas dos ratos estão apresentadas em tabela no Apêndice A.

O procedimento de injeção das partículas nos ratos está ilustrado nas Figuras 12a, 12b e 12c. Inicialmente, os ratos foram anestesiados com injeção intramuscular de Quetamina 1 ml (50 mg) associada à Xilazina 1 ml (20 mg), sendo esta solução utilizada de 0,1 a 0,2 ml para cada 100 g do animal. A aplicação teve início com a Xilazina e, após sedação, aplicou-se a Quetamina. Em seguida, foi registrado o peso de cada rato que foi devidamente identificado.

As soluções contendo as partículas metálicas foram agitadas vigorosamente e injetadas na região intraperitoneal utilizando-se uma agulha 20/7. Para cada solução contendo o metal, foram utilizados dez ratos, formando-se, portanto, três grupos. Mais dez ratos formaram o grupo controle, nos quais foram injetadas as mesmas quantidades de solução, na mesma taxa, porém sem as partículas. Dos cinco ratos que serviram como reserva, dois morreram durante a anestesia.

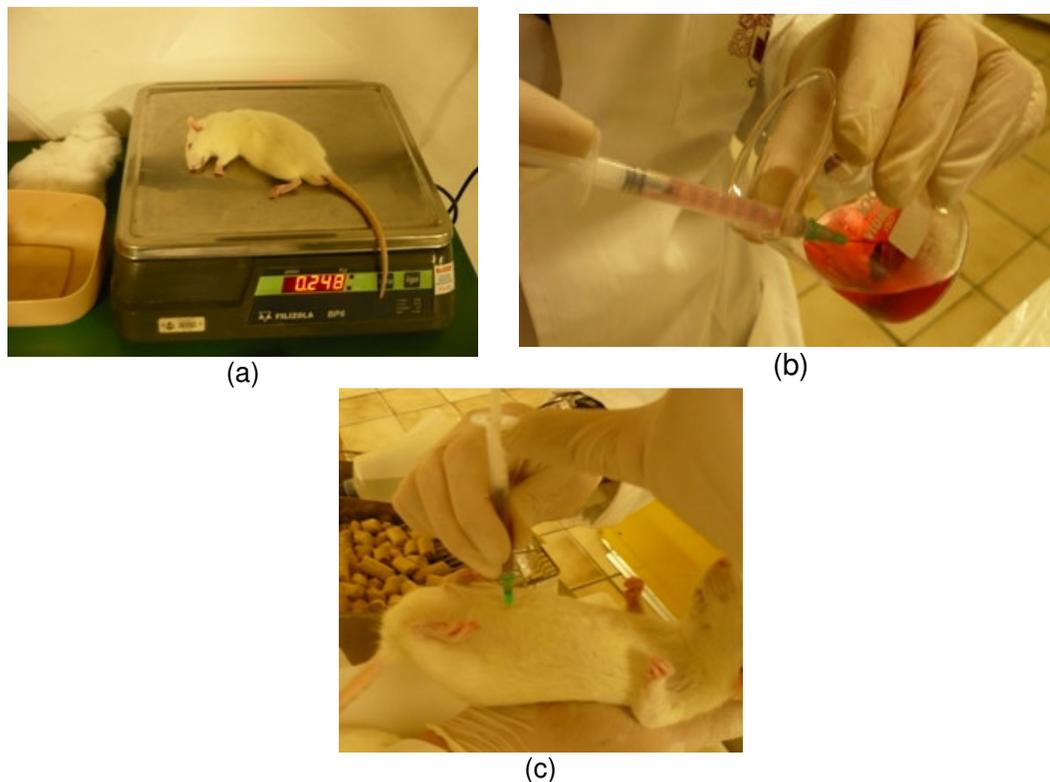


Figura 12: (a) Pesagem da cobaia anestesiada, (b) solução de Hank contendo as partículas metálicas, (c) injeção no peritônio da cobaia.

Os animais foram observados imediatamente após retornarem da anestesia, período considerado crítico e após 4, 24, 48 e 72 horas a fim de se verificar quaisquer sinais de intoxicação.

Os animais permaneceram em observação por 35 dias no Biotério da PUCPR, com 5 ratos em cada gaiola, mantidos em ciclo claro/escuro de 12h/12h, em temperatura de 22°C e com alimentação e água *ad libitum* (SANTOS *et al.*, 2003).

No 35º dia foi realizada a eutanásia de acordo com o procedimento aprovado pelo Comitê de Ética, ou seja, com administração intracardíaca de Quetamina e Xilazina. Após a eutanásia, foi realizada a dissecação dos ratos para a separação dos rins, pulmões, coração e fígado. A dissecação foi realizada de acordo com a sequência de incisões convencionais para exposição das vísceras: incisão longitudinal, afastamento da pele, remoção da pele e incisão da musculatura abdominal, com conseqüente afastamento dela para acesso às vísceras. As Figuras 13a, 13b, 11c e 13d mostram as vísceras separadas de um dos animais.

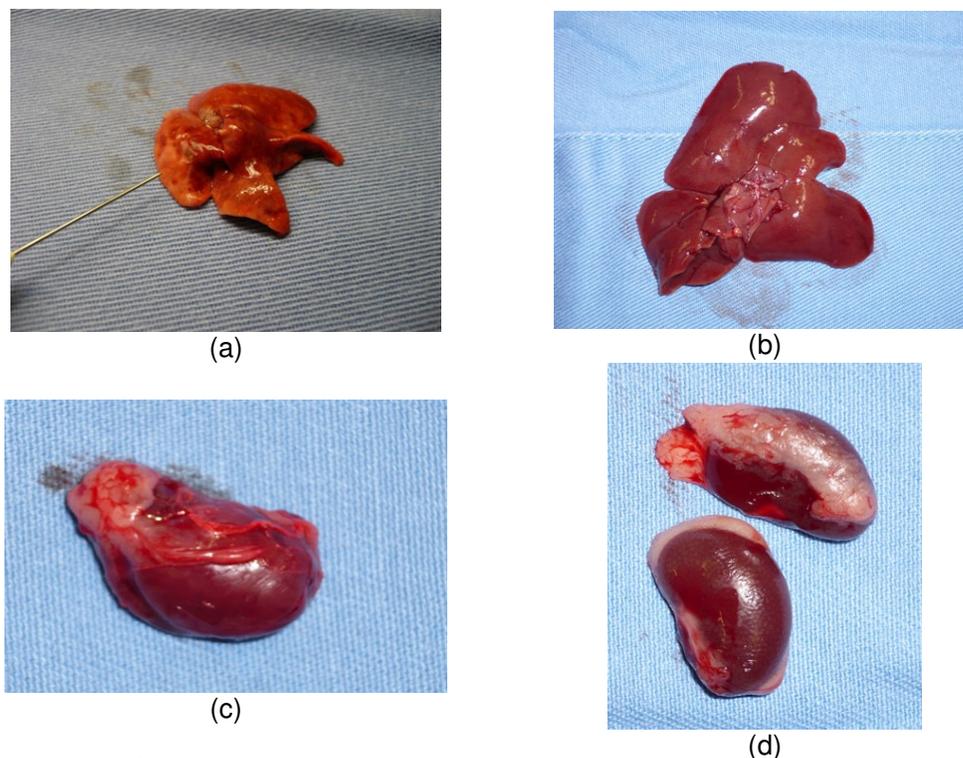


Figura 13: Órgãos dissecados de um dos animais. (a) pulmão, (b) fígado, (c) coração e (d) rins.

Durante a dissecação, foram registradas anormalidades de cor e consistência observadas nos tecidos dos órgãos que foram fixados com formalina (formol 10%), respeitando a relação 1:10 entre o volume da peça anatômica e o volume do fixador, como ilustra a Figura 14, e encaminhados para a reprodução em lâminas histológicas para análise.



Figura 14: Órgãos imersos em formalina para conservação até a preparação das amostras para a análise histopatológica.

3.3. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Para a análise histológica, foram retiradas amostras de cada órgão retirado de cada um dos ratos, tanto dos que receberam as partículas como dos que serviram como controle. Foram retiradas duas porções de cada amostra, uma cortical e uma medular. A camada cortical (externa) serviu para observação da superfície do material e a camada mais interna (medular) para observação profunda do tecido.

As amostras foram separadas em frascos plásticos de 80 ml, contendo formalina para a sua fixação, também respeitando a relação 1:10 entre o volume da peça e o volume do fixador para evitar a destruição das células e proporcionar o endurecimento do tecido para favorecer as etapas subsequentes de preparação. Cuidados para não dobrar ou comprimir as peças foram tomados e elas foram transferidas para os recipientes já contendo o fixador a fim de se evitar aderência das peças nas paredes do recipiente.

As amostras dos tecidos retirados dos órgãos de cada rato foram, inicialmente, posicionadas em cassetes, como ilustra a Figura 15. Em seguida, foram desidratadas por meio de imersão subsequente (concentrações crescentes) em frascos contendo as seguintes soluções: álcool absoluto diluído com formalina a 4% (solução 80%), álcool absoluto diluído com formalina a 4% (solução 90%), álcool absoluto (99%); álcool absoluto (99%); álcool absoluto (99%). Este processo permite a retirada da água dos tecidos, permitindo a impregnação da parafina.



Figura 15: Posicionamento do tecido em cassete para a preparação para a análise histológica.

Para melhorar a penetração da parafina, as amostras foram diafanizadas utilizando três banhos subsequentes de xilol. Em seguida, foram realizadas as impregnações de parafina em dois banhos consecutivos, com cerca de 30 minutos cada, para que fosse possível o corte fino do material e a sua visualização em microscópio ótico. Para tanto, as amostras foram imersas em parafina líquida em 60°C, mantidas em estufa para total penetração no tecido. A Figura 16 mostra tecidos após os banhos em parafina.

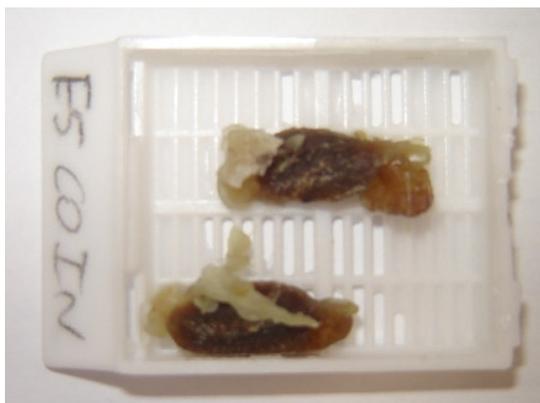


Figura 16: Aparência dos tecidos após a impregnação com parafina.

Para a fabricação do bloco de parafina, as peças que estavam na estufa foram transferidas para formas retangulares refrigeradas com água amoniacal 10%, onde foi despejada a parafina fundida. Depois de solidificado, o bloco foi retirado para os cortes em micrótomo. Estes processos estão ilustrados nas Figuras 17a e 17b.

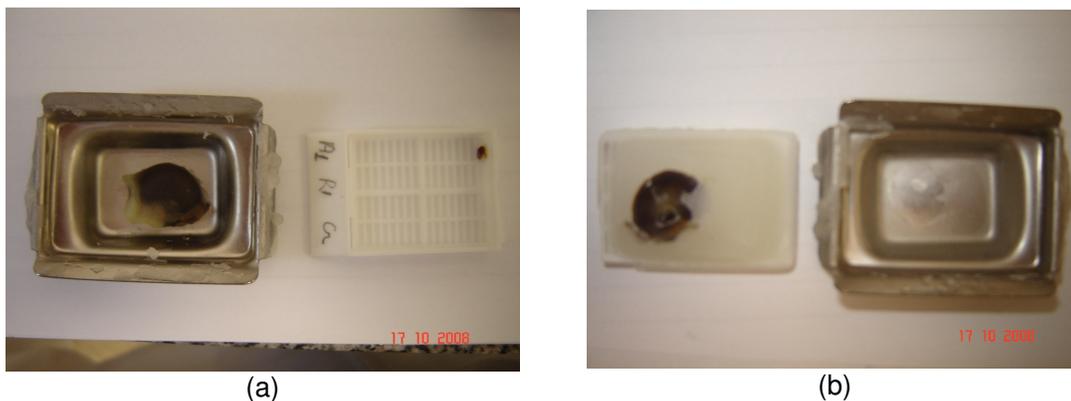


Figura 17: (a) Posicionamento do tecido para o processo de inclusão e (b) bloco de parafina com o tecido incluído.

A obtenção de fatias finas (4 μm) sucessivas das peças incluídas foi conseguida em um micrótomo Marca SLEE MAINZ e modelo CUP 5062. As Figuras 18a e 18b mostram o posicionamento do bloco de parafina e o corte, respectivamente.



Figura 18: (a) Micrótomo com o bloco de parafina posicionado e (b) corte do bloco de parafina.

As fitas resultantes do corte no micrótomo foram transferidas com uma pinça para um banho-maria com água aquecida em 56°C , abaixo do ponto de fusão da parafina para serem distendidas. Após a distensão, as fitas foram pescadas com as lâminas previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 80% e secas. Antes da pescagem, as lâminas receberam uma camada de albumina para facilitar a adesão da peça. O procedimento de pescagem pode ser observado na Figura 19.



Figura 19: Procedimento de pescagem das fitas cortadas em micrótomo, colocadas em banho-maria para distensão.

As lâminas com as fitas aderidas foram, então, posicionadas em estufa a 70°C durante 25 minutos para secagem e retirada da parafina impregnada.

Os tecidos preparados sofreram coloração para a visualização de suas estruturas. Para eliminar a parafina que permaneceu na lâmina de vidro e hidratar o tecido, foram realizados, em todas as lâminas: um banho em xilol quente (5 min), um em xilol frio (2 min), três banhos durante 1 min de forma sequencial em álcool 100%, 95% e 70% e uma lavagem em água corrente durante 2 min.

Os corantes utilizados foram os mais comuns nos procedimentos histológicos que são a Hematoxilina, uma base que cora componentes ácidos das células, tornando o DNA, RNA e o núcleo das células azulados, e a Eosina, um ácido que torna rosadas as substâncias presentes no citoplasma das células (TIMM, 2005).

A sequência de coloração respeitou as seguintes etapas: imersão em Hematoxilina durante 1 min e 30 s, lavagem em água corrente, imersão em Eosina durante em 1 min, lavagem em água corrente, desidratação com imersão em álcool absoluto e lavagem com xilol. A sequência dos banhos é mostrada na Figura 20.



Figura 20 Seqüência utilizada para a coloração das lâminas.

Para a montagem final da lâmina, foi depositada, sobre o tecido, uma gota da resina Bálsamo do Canadá e coberto com uma lamínula de vidro com cuidado para evitar a formação de bolhas. Este procedimento garante a durabilidade do tecido para as análises histológicas.

Após a montagem final, as lâminas foram devidamente etiquetadas e deu-se início à análise histológica.

3.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a execução da análise histológica, foram separadas as 164 lâminas em 4 grupos de 41 lâminas, definidos pelos órgãos: pulmão, coração, rim e fígado. Inicialmente, para evitar uma análise condicionada, todos os cortes histológicos foram examinados sem o conhecimento do grupo ao qual pertenciam. Foram considerados os seguintes padrões histológicos: edema, infiltração inflamatória, hemorragia e necrose parenquimatosa, granuloma e calcificação.

Após a identificação das lesões nos tecidos, as identificações das lâminas foram descobertas para a análise dos resultados.

O microscópio ótico utilizado foi um Nikon modelo Alphaphot -2 YS 2, com aumento de 40x para avaliação do campo total e de 400 x ou 1000 x para análise do local de interesse.

3.5. PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Através da análise visual dos tecidos dos órgãos isolados, foram separadas amostras de 12 ratos que mostraram algum aspecto de contaminação por metais, sendo três de cada grupo. Estas amostras foram preparadas para análise em MEV com o intuito de se rastrear a presença de metais componentes das ligas em tecidos do fígado, rim, pulmão e coração.

Foram separados os tecidos de, aproximadamente, 5 mm de espessura de áreas diferentes dos tecidos dos órgãos que apresentaram lesão. Para o rim, foram coletadas amostras da região cortical, da região medular ou de preferência metade de um rim cortado ao meio (aberto), sendo estas peças fixadas imediatamente após a sua retirada. Este procedimento foi o adotado para os outros órgãos.

Como o ideal é verificar a deposição destes metais na parte interna destes órgãos e não somente sobre a superfície dos mesmos, foi utilizada a técnica de MEV de quebra.

Os tecidos foram imersos em nitrogênio líquido e em seguida foram quebrados possibilitando o acesso às estruturas internas dos órgãos e a detecção

dos diferentes metais no parênquima que constitui os respectivos órgãos. A seguir foram imersos em solução fixadora de Karnovsky por 2 horas. A solução de Karnovsky é utilizada, normalmente para a fixação de tecidos para análise em microscópio eletrônico e é composta de glutaraldeído com concentração final de 2,5% acrescido do paraformaldeído a 4%, ambos diluídos em solução tampão de cacodilato (ácido cacodílico) e, para este procedimento, foi mantido o pH de 7,4 e a molaridade de 0,15 M. Para uma boa fixação, as peças coletadas devem ser pequenas, porém representando toda a arquitetura das áreas de interesse e, além disso, o fixador deve ter um volume de, no mínimo, 10 vezes o tamanho da amostra, sendo o ideal 30 vezes.

Após a fixação os tecidos foram transportados para recipientes contendo glutaraldeído 0,5% em tampão Cacodilato 0,15 M e pH 7,4, para sua conservação, onde permaneceram imersos e em 4°C até a obtenção dos resultados da análise em microscópio ótico, a fim de se selecionar apenas os tecidos que apresentaram lesões.

Com os resultados do MO, os tecidos selecionados foram lavados 3 vezes na solução tampão cacodilato 0,1 M, com 10 minutos de intervalo em cada lavagem, para a retirada dos resíduos de glutaraldeído. Foram então, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, durante 15 min. no escuro e na temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M, 3 vezes e desidratadas em banhos subseqüentes de álcool 50%, 70%, 90% e 100%, de 10 a 20 minutos cada. Posteriormente, os materiais foram levados ao aparelho de ponto crítico (CO₂) para completar a secagem e cobertos com uma fina camada de ouro para permitir a sua visualização em MEV e para a análise química EDS.

3.6. ANÁLISE DOS TECIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

As amostras dos tecidos foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) marca Jeol, modelo JSM-6360LV com EDS para a identificação das partículas metálicas.

Para se ter um parâmetro dos padrões normais da arquitetura tecidual (análise morfológica e ultra-estrutural) e dos parâmetros da micro análise em EDS, fez-se a análise dos órgãos dos animais do grupo controle através das imagens do parênquima tecidual e da composição química padrão de cada órgão.

Com a observação do padrão da arquitetura tecidual e composição química de cada órgão, procedeu-se à análise do mesmo órgão dos grupos que sofreram a injeção das partículas. Foram realizadas comparações destes tecidos com os tecidos do grupo controle e realizadas as varreduras com EDS para a identificação dos elementos químicos presentes.

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados, neste capítulo, na mesma sequência da metodologia, ou seja, produção das partículas metálicas, análise histológica em microscópio ótico e análise em microscópio eletrônico de varredura.

4.1. PRODUÇÃO DAS PARTICULAS METÁLICAS

As Figuras 21a, 22b e 23c mostram as formas e a distribuição de tamanhos das partículas produzidas a partir das ligas Ti6Al4V, aço inox 316L e CoCrMo, respectivamente.

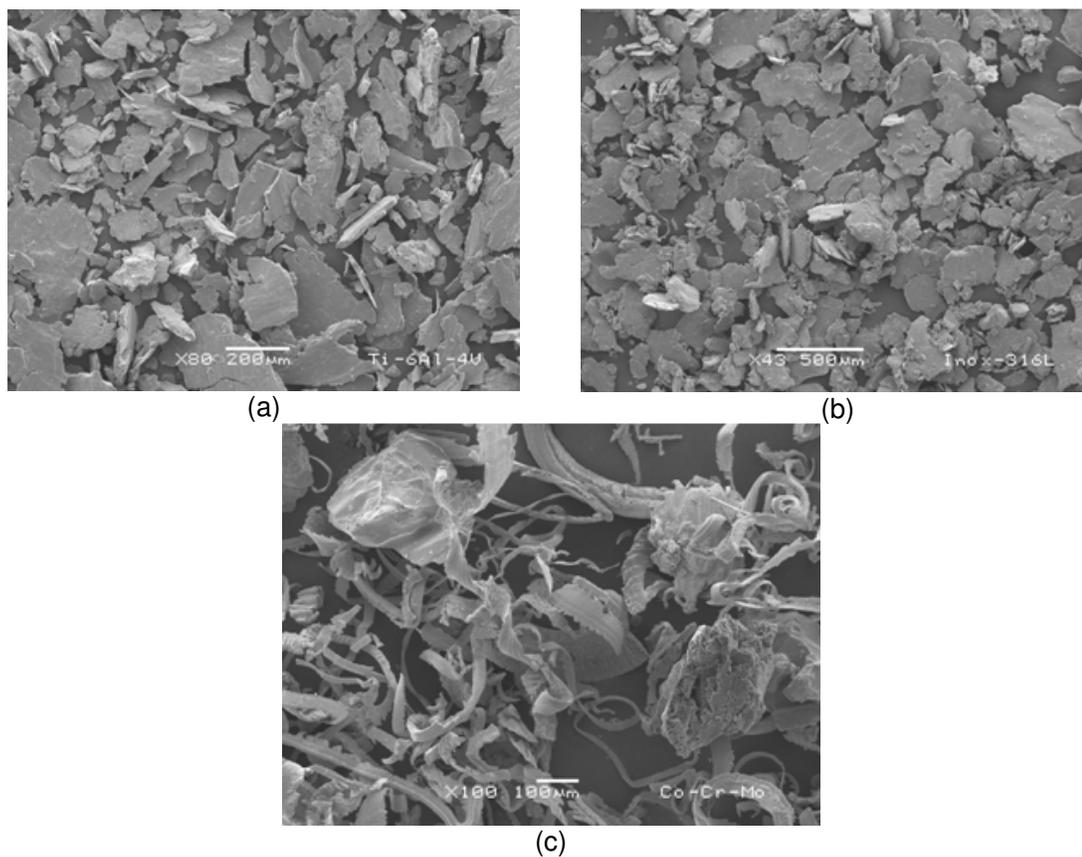


Figura 21: (a) Partículas de Ti6Al4V, (b) partículas de aço inox 316L e (c) partículas de CoCrMo, observadas em MEV.

As partículas de Ti6Al4V e de aço inox 316L produzidas apresentaram formas semelhantes, porém com variação de tamanhos diferentes. Devido à utilização do esmeril na peça de CoCrMo, foram obtidas partículas maiores, menos uniformes e em formas alongadas (cavacos).

Os valores das massas das peças, pesadas em uma balança Marte modelo AS2000C, antes e depois de atritadas, estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Massas das peças metálicas.

Peças		Massa antes do atrito (g) ± 0,02 g	Massa depois do atrito (g) ± 0,02 g
Ti6Al4V	superior	43,53	43,31
	inferior	54,60	52,63
CoCrMo	superior	13,93	13,93
	inferior	210,98	210,88
Aço inox 316L	superior	74,18	73,32
	inferior	152,29	147,55

A Tabela 6 mostra os valores das massas de partículas obtidas para cada liga metálica, utilizando-se uma balança analítica Mettler–Toledo, modelo AB204.

Tabela 6: Massa de partículas metálicas e tempo para obtenção.

Liga metálica	Massa de partículas (g) ± 0,001g
Ti6Al4V	0,300
CoCrMo	0,100
Aço inox 316L	1,803

4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Da população de 45 ratos, 2 do grupo reserva e 2 do grupo controle morreram após a retirada do sangue antes da eutanásia, provavelmente devido à anestesia. Dois ratos do grupo reserva foram utilizados, portanto, para completar o grupo de 10 ratos do grupo controle.

Das 164 lâminas analisadas de todos os grupos de órgãos, em apenas 7 foram encontradas lesões, na maioria, granuloma epitelióide de corpo estranho.

As Figuras 22a e 22b mostram um granuloma epitelióide encontrado na lâmina de tecido isolado do coração de um dos ratos que sofreu injeção de partículas da liga Ti6Al4V.

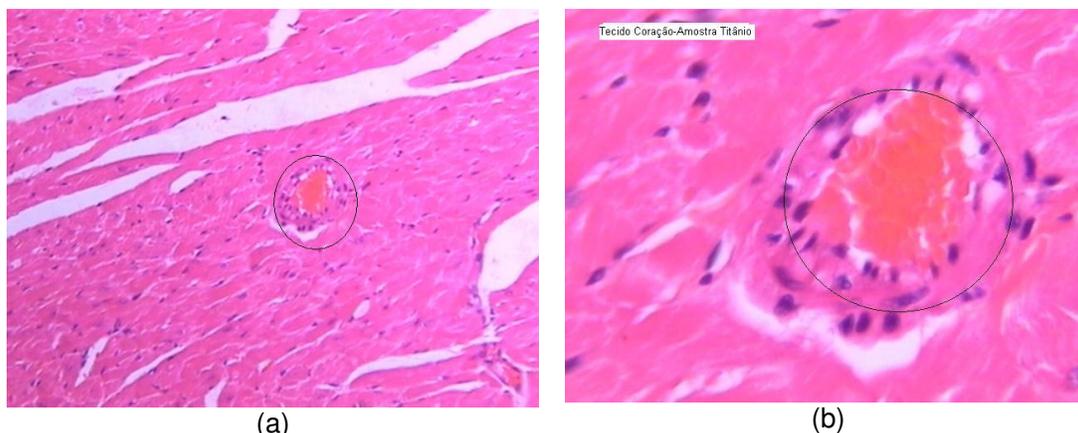


Figura 22 (a) Amostra de tecido do coração de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Ti6Al4V com a identificação do granuloma epitelióide (círculo), 40x, (b) amplificação do granuloma tipo corpo estranho, mostrando o acúmulo de macrófagos ao seu redor.

As Figuras de 23 a 25 mostram granuloma epitelióide tipo corpo estranho, onde os núcleos estão dispostos de forma aleatória no citoplasma, no fígado, no coração e granuloma tipo corpo estranho e células gigantes no pulmão, respectivamente, em três ratos distintos, onde foram injetadas as partículas de inox 316L. No rato com granuloma no pulmão, foi detectada pneumonia grave em organização.

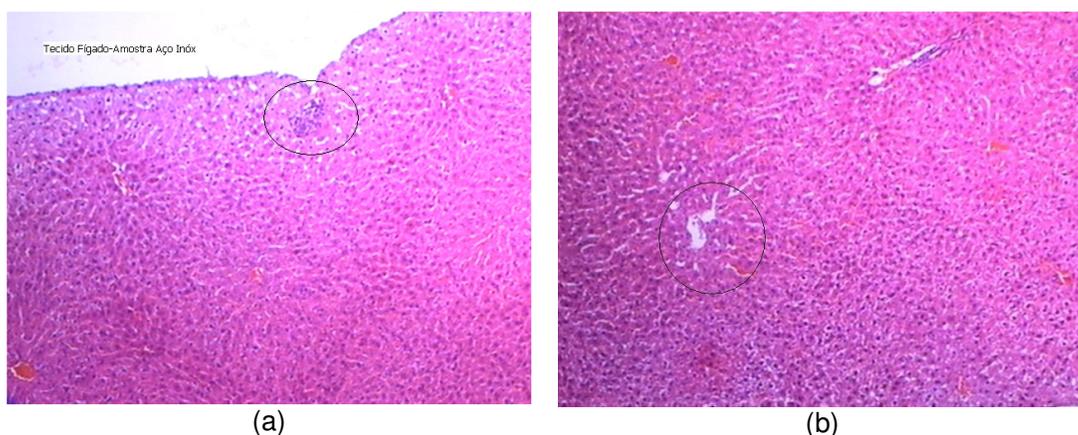


Figura 23: (a) e (b) Amostra de tecido do fígado de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Inox 316L com a identificação de dois pequenos granulomas epitelióides, 40x.



Figura 24: Amostra de tecido do coração de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Inox 316L com a identificação granuloma epitelióide tipo corpo estranho com agrupamento de fagócitos e com material não digerido em seu interior (região mais clara), 1000x.

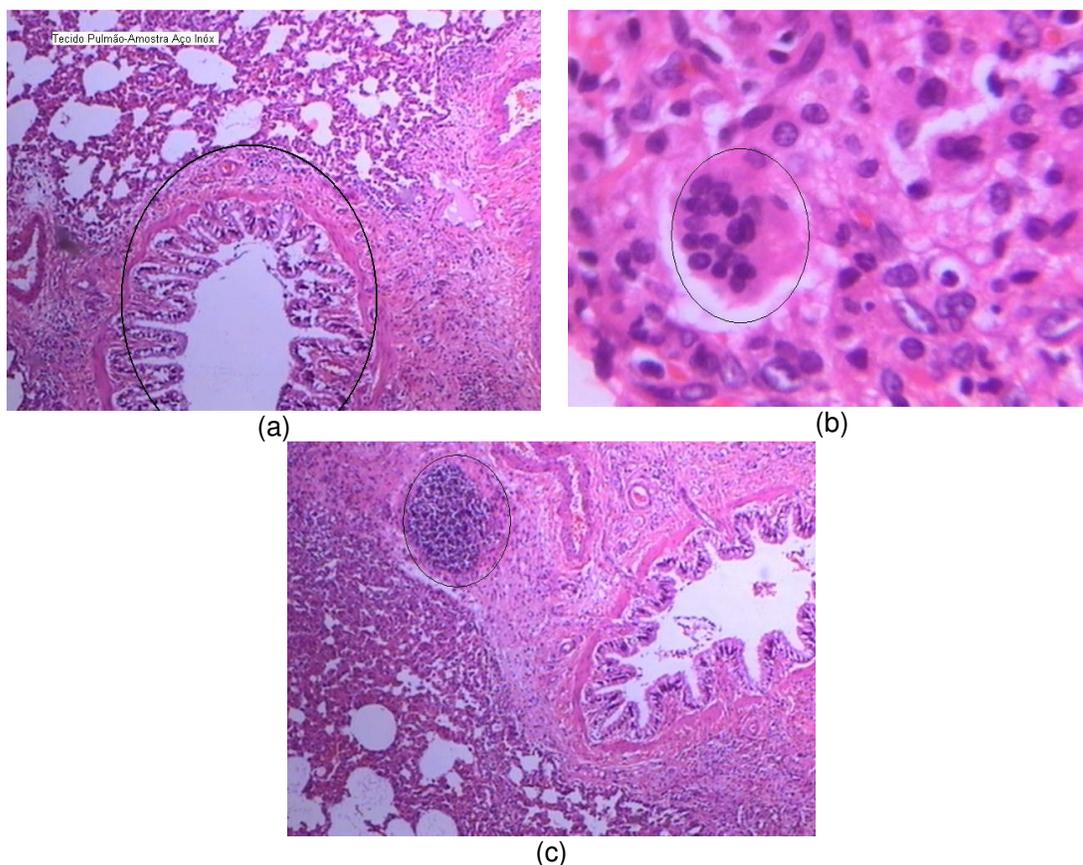


Figura 25: Amostra de tecido do pulmão de um dos ratos que sofreu injeção de partículas de Inox 316L com a identificação de (a) pneumonia grave em organização, (b) células gigantes e (c) granuloma epitelióide tipo corpo estranho, 40x, 400x e 40x, respectivamente.

Os granulomas de corpo estranho encontrados nas lâminas foram identificados devido ao número de macrófagos ao seu redor.

No grupo de ratos injetados com partículas da liga CoCrMo, apenas em um dos ratos foi detectado granuloma epitelióide no fígado e células gigantes e granuloma tipo corpo estranho no pulmão.

A Figura 26 mostra os resultados obtidos na análise histológica das lâminas dos tecidos do fígado e pulmão do rato que sofreu injeção de partículas da liga CoCrMo.

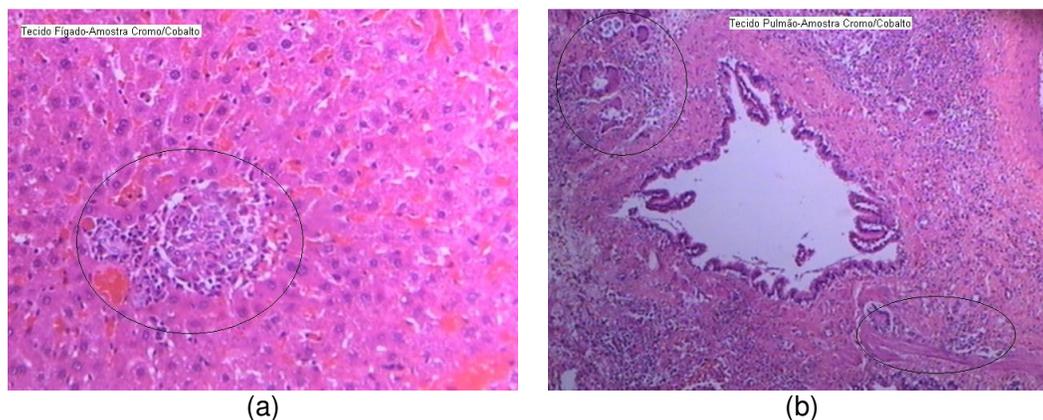


Figura 26: (a) Amostra de tecido do fígado de rato que sofreu injeção de partículas da liga CoCrMo com a identificação de granuloma epitelióide e (b) amostra de tecido do pulmão de rato que sofreu injeção de partículas da liga CoCrMo com a identificação de granuloma epitelióide (base) e células gigantes (topo), 40x e 1000x, respectivamente.

Em relação às amostras dos tecidos dos ratos do grupo controle, injetados apenas com solução de Hank, foi encontrado granuloma epitelióide somente em uma amostra do fígado de um dos ratos do grupo. A Figura 27 mostra o resultado da análise histológica.

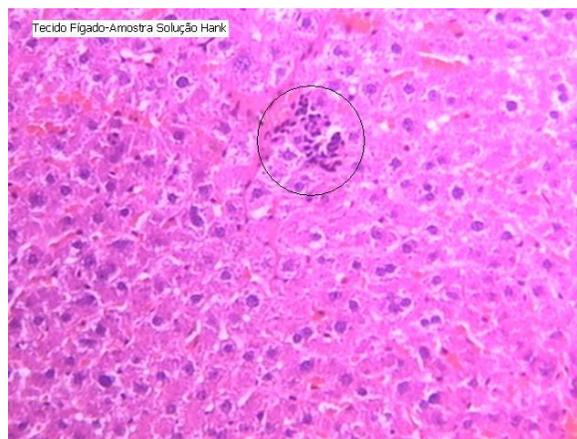


Figura 27: Amostra de tecido do fígado de um rato que sofreu injeção de solução de Hank, sem partículas metálicas, pertencente ao grupo controle. Observa-se um pequeno granuloma epitelióide, 1000x.

A solução de Hank pode sofrer alterações em meio fisiológico, causando algum processo inflamatório na região onde foi aplicada e o fígado está localizado na região de peritônio, mesma região onde foram injetadas as soluções nos animais.

Os resultados das análises histológicas estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7: Resumo dos resultados encontrados, em ratos distintos, com a análise histológica.

Liga metálica injetada	Órgão	Tipo de lesão encontrada	Número de lâminas com lesão	Número total de lâminas (todos os órgãos)
Ti6Al4V	coração	granuloma epitelióide	1	41
CoCrMo (mesmo rato)	fígado	granuloma epitelióide	1	41
	pulmão	granuloma epitelióide e células gigantes	1	
Inox 316L	fígado	granuloma epitelióide	1	41
	coração	granuloma epitelióide	1	
	pulmão	granuloma epitelióide e células gigantes	1	
Grupo controle	fígado	granuloma epitelióide	1	41

Nenhuma amostra de tecido dos rins acusou lesão. Na maioria dos casos, os metais são filtrados e eliminados pela via urinária (RUBIO *et al.*, 2007). Seria necessário um exame de urina para que se chegasse a um resultado mais conclusivo sobre a incidência de metais nos rins. O exame de urina não foi realizado neste trabalho devido à impossibilidade de coleta deste material no biotério onde os animais foram manejados.

4.3. ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

Não foi possível observar alterações histológicas nos tecidos por meio da microscopia eletrônica. Todos os tecidos analisados mostraram estruturas de tecido normal. Por isso, não foram registradas as imagens. No entanto, o MEV utilizado era munido de microsonda EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raio-X), possibilitando a análise da composição química dos tecidos e a procura de elementos metálicos liberados pelas ligas. Foram analisados, com esta técnica, os tecidos do fígado e do coração. Tecido do pulmão que apresentou lesão não foi

analisado, por não ter sido um dos tecidos anteriormente isolado para a preparação para o MEV, antes da preparação para o MO.

As Figuras de 28 a 30 e as Tabelas de 8 a 11 apresentam os resultados do EDS para os tecidos do fígado para cada liga e para o grupo controle.

A Figura 28 mostra o diagrama de análise EDS para o tecido do fígado de rato que sofreu injeção da solução de Hank sem partículas metálicas, pertencente ao grupo controle.

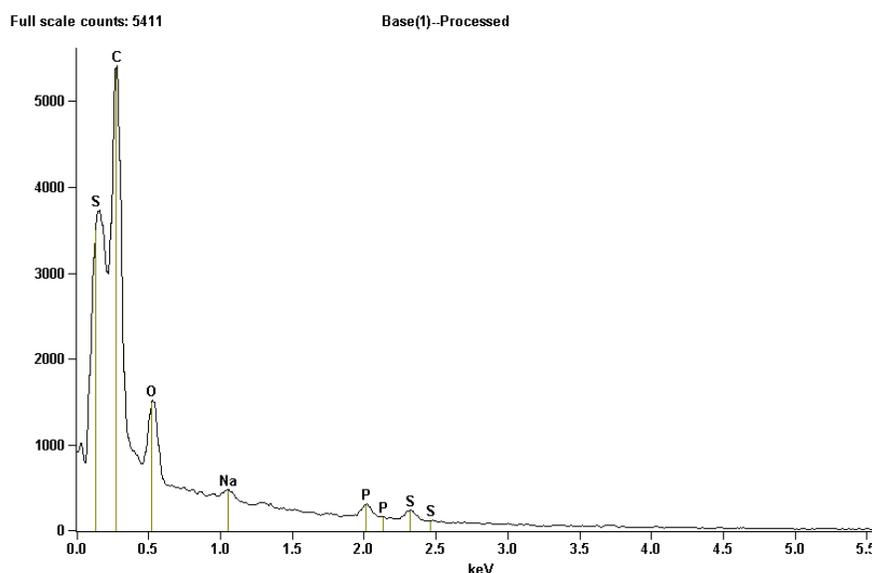


Figura 28: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado de rato (cortical) que sofreu injeção de solução de Hank livre de partículas metálicas.

A Tabela 8 mostra as porcentagens em massa e as porcentagens atômicas de cada elemento presente no tecido, identificado pela microsonda EDS.

Tabela 8: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado de rato que sofreu injeção de solução de Hank livre de partículas metálicas.

Elementos	Contagem	% em massa	Erro % em massa	% atômica	Erro % atômica
C	36582	67,03	+/- 0,72	73,59	+/- 0,79
O	5713	30,78	+/- 1,10	25,36	+/- 0,91
Na	1110	0,85	+/- 0,10	0,49	+/- 0,06
P	1626	0,67	+/- 0,06	0,28	+/- 0,03
S	1362	0,68	+/- 0,07	0,28	+/- 0,03
Total		100,00		100,00	

Os resultados mostraram não haver presença de quaisquer elementos pertencentes às ligas, como era esperado. O único metal presente é o sódio (Na), que faz parte da composição da solução de Hank na forma de cloreto de sódio (NaCl) e de bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

As Figuras 28 e 29 mostram o diagrama de análise EDS para o tecido do fígado medular e cortical, respectivamente, de rato que sofreu injeção da solução de Hank com partículas de aço inox 316L e as Tabelas 9 e 10 mostram as porcentagens dos elementos químicos detectados em cada caso.

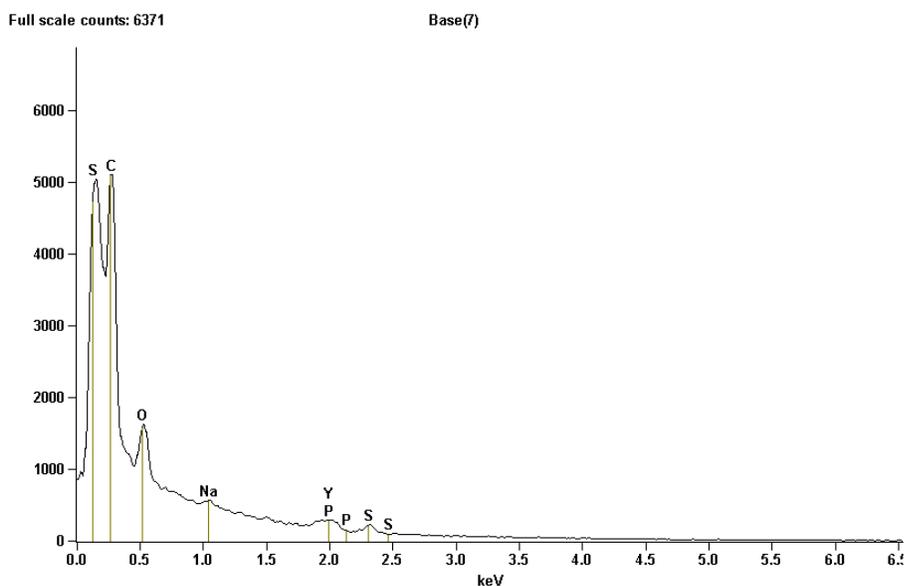


Figura 29: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.

Tabela 9: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.

Elementos	Contagem	% em massa	Erro % em massa	% atômica	Erro % atômica
C	33886	67,58	+/- 0,83	74,58	+/- 0,92
O	4464	29,29	+/- 1,51	24,27	+/- 1,25
Na	901	0,83	+/- 0,14	0,48	+/- 0,08
P	935	0,46	+/- 0,04	0,19	+/- 0,02
S	1276	0,76	+/- 0,05	0,32	+/- 0,02
Y	1392	1,08	+/- 0,10	0,16	+/- 0,02
Total		100,00		100,00	

Neste tecido foi encontrado 1,08% de ítrio, um elemento geralmente presente em pequena quantidade na composição do aço inoxidável a fim de aumentar a sua

resistência à corrosão (RIFFARD *et al.*, 2002). Esse elemento não foi detectado no grupo controle.

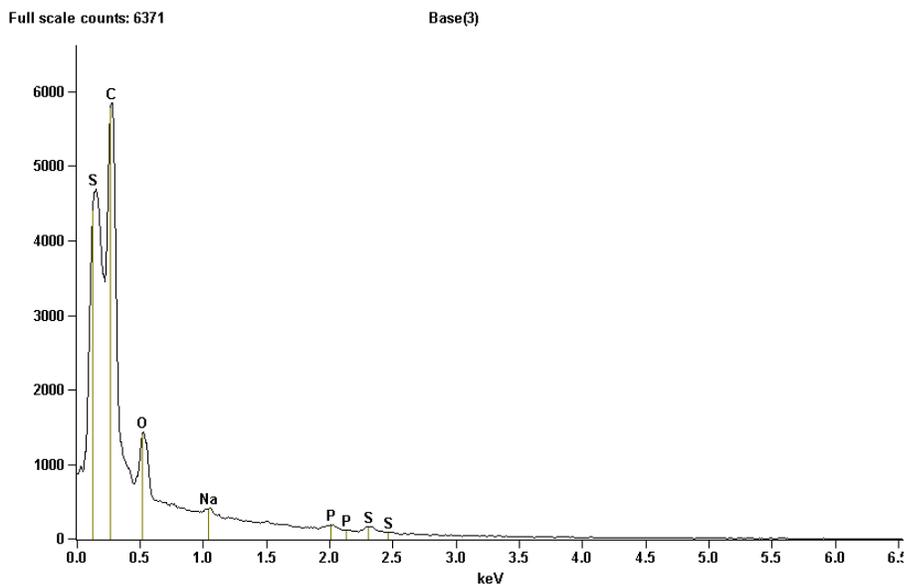


Figura 30: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.

Tabela 10: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de aço inox 316L.

Elementos	Contagem	% em massa	Erro % em massa	% atômica	Erro % atômica
C	40087	69,95	+/- 0,72	76,01	+/- 0,79
O	4437	28,50	+/- 1,28	23,25	+/- 1,04
Na	688	0,61	+/- 0,11	0,35	+/- 0,06
P	766	0,37	+/- 0,06	0,15	+/- 0,02
S	975	0,57	+/- 0,07	0,23	+/- 0,03
Total		100,00		100,00	

Não foi detectado elemento pertencente à composição do aço inox 316L na porção cortical do fígado. A porção cortical é a mais superficial do órgão. De acordo com os resultados, portanto, a contaminação ocasionada pela presença do aço inox 316L ocorreu na porção mais interna do fígado (medular).

A Figura 31 e a Tabela 11 mostram os resultados do EDS para o tecido do coração de rato que sofreu injeção de solução de Hank contendo partículas da liga Ti6Al4V.

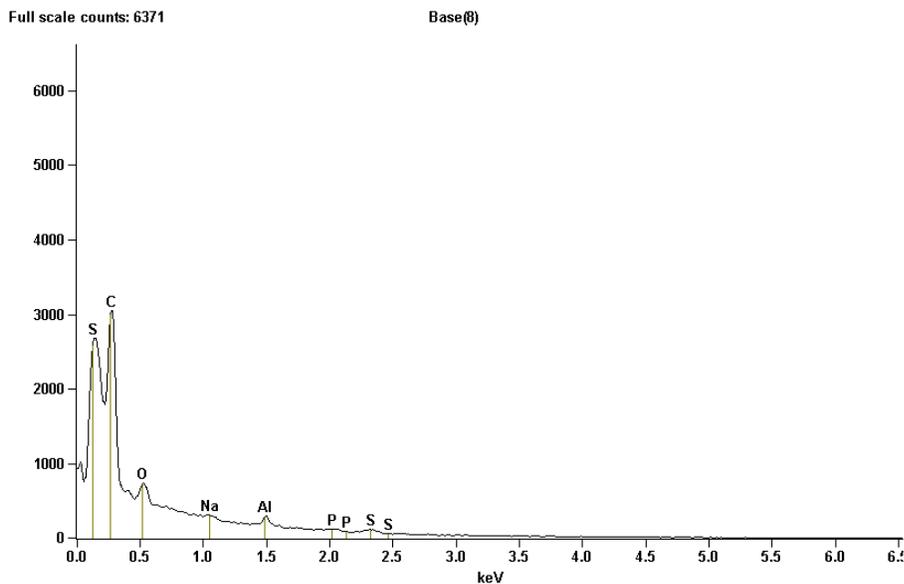


Figura 31: Diagrama da análise química por EDS para tecido do coração cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de Ti6Al4V.

Tabela 11: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do coração cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas de Ti6Al4V.

Elementos	Contagem	% em massa	Erro % em massa	% atômica	Erro % atômica
C	18083	78,77	+/- 1,30	84,10	+/- 1,39
O	1016	17,90	+/- 2,89	14,34	+/- 2,32
Na	410	0,83	+/- 0,15	0,46	+/- 0,08
Al	932	1,16	+/- 0,13	0,55	+/- 0,06
P	327	0,38	+/- 0,07	0,16	+/- 0,03
S	683	0,97	+/- 0,14	0,39	+/- 0,06
Total		100,00		100,00	

Os resultados mostram a presença de alumínio no tecido do coração, elemento químico que faz parte da composição da liga Ti6Al4V, indicando a contaminação do tecido devido à sua presença no organismo do animal.

As Figuras 32 e 33 e as Tabelas 12 e 13 mostram os resultados referentes ao EDS do tecido do fígado medular e cortical, respectivamente, de rato que sofreu injeção de solução de Hank contendo partículas da liga CoCrMo.

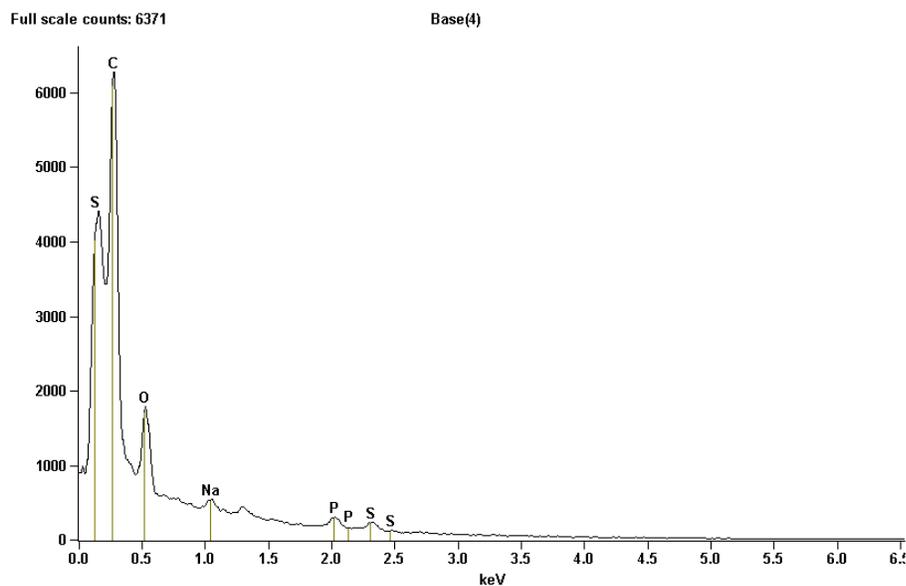


Figura 32: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo.

Tabela 12: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado medular de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo.

Elementos	Contagem	% em massa	Erro % em massa	% atômica	Erro % atômica
C	41721	65,65	+/- 0,66	72,38	+/- 0,73
O	6309	31,99	+/- 1,10	26,48	+/- 0,91
Na	1266	0,96	+/- 0,11	0,55	+/- 0,06
P	1706	0,69	+/- 0,06	0,29	+/- 0,03
S	1450	0,71	+/- 0,07	0,29	+/- 0,03
Total		100,00		100,00	

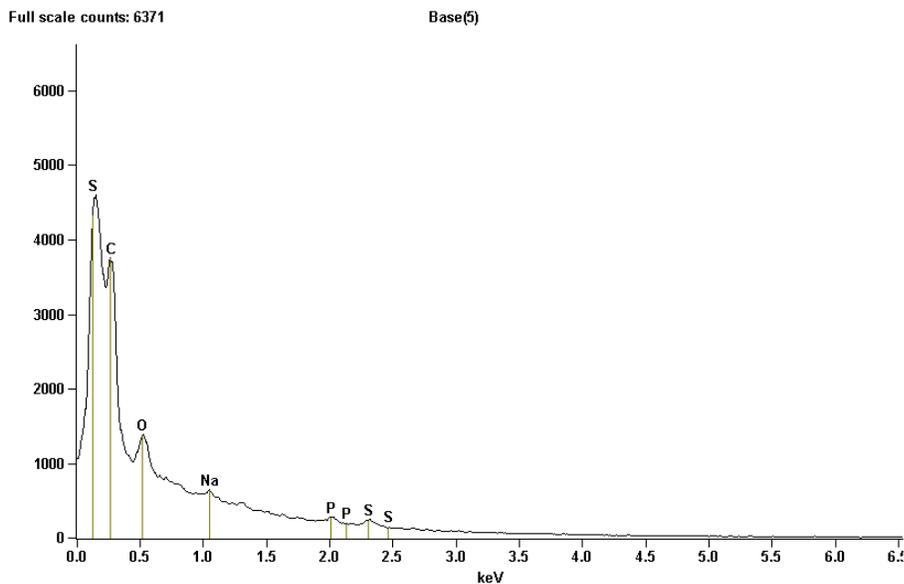


Figura 33: Diagrama da análise química por EDS para tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo.

Tabela 13: Composição química em porcentagem de elementos presentes no tecido do fígado cortical de rato que sofreu injeção de solução de Hank com partículas da liga CoCrMo

Elementos	Contagem	% em massa	Erro % em massa	% atômica	Erro % atômica
C	23508	67,98	+/- 1,12	74,63	+/- 1,23
O	3060	29,02	+/- 2,16	23,92	+/- 1,78
Na	935	1,25	+/- 0,22	0,72	+/- 0,13
P	906	0,65	+/- 0,11	0,28	+/- 0,05
S	1256	1,10	+/- 0,14	0,45	+/- 0,06
Total		100,00		100,00	

Os resultados não mostram indícios dos elementos químicos presentes na composição da liga CoCrMo nos tecidos do fígado.

5. DISCUSSÃO

Na análise de todos os grupos, a maior quantidade de lesões identificadas, em comparação com o grupo controle, foi encontrada na amostra referente à injeção das partículas de Inox 316L.

A produção das partículas metálicas foi realizada por um dispositivo especialmente desenvolvido para produzir partículas de Ti6Al4V e Inox 316L, com a produção de quantidade adequada e geometrias similares. A obtenção do tamanho de partículas da liga Ti6Al4V esteve entre 50 e 200 μm e do Inox 316 L entre 100 e 500 μm . Esta variação no tamanho das partículas, assim como a diferença em quantidade mostrada na Tabela 4, pode ser explicada pelas características de encruamento superiores da liga Ti6Al4V em relação ao Inox 316L, apesar da dureza superior do Inox, 45 HRC contra 36 HRC da liga Ti6Al4V. Quanto maior a dureza do material, maior a sua resistência à abrasão. No entanto, ocorreu aumento da dureza da liga Ti6Al4V devido ao processo de deformação a frio do material durante o atrito entre as peças, dificultando a obtenção das partículas. A liga CoCrMo é muito superior em dureza do que as demais, cerca de 90 HRC, o que explica a impossibilidade de obtenção das suas partículas pelo mesmo método (ASM HANDBOOK, 1992).

Como apresentado nos resultados, no grupo de ratos injetados com partículas da liga CoCrMo, apenas em um foi detectado granuloma epitelióide no fígado e células gigantes e granuloma tipo corpo estranho no pulmão. Neste grupo específico, o processo de produção das partículas não seguiu o mesmo método das outras amostras de metais injetados nos outros grupos de ratos. As partículas foram obtidas em formato alongado diferente dos formatos das outras ligas e os tamanhos um pouco superiores. Este fato pode explicar a existência de lesões em tecidos de dois órgãos do mesmo rato.

Apesar do processo de obtenção diferenciado das partículas de CoCrMo, optou-se por injetá-las nos ratos, pois partículas maiores e alongadas poderiam fornecer dados interessantes em relação às reações adversas no organismo dos animais.

Segundo a literatura, partículas de materiais liberados no organismo com tamanho variando entre 1,5 μm e 5 μm são absorvidas por macrófagos e levadas para outros órgãos pela corrente sanguínea, podendo ser encontrados no coração, pulmão, cérebro e gânglios linfáticos. No entanto, partículas acima de 10 μm permanecem no local onde foram produzidas ou introduzidas e são encapsuladas pelo organismo (CHOI *et al.*, 2005).

Neste trabalho foi encontrado um elemento químico que, geralmente, faz parte da composição química do aço inox 316L, evidenciado pelo EDS, no fígado. De acordo com o resultado do MEV realizado antes da sua aplicação, pode-se verificar uma variação de tamanho de partículas entre 100 e 500 μm . Portanto, este tamanho de partículas pode ter sido impeditivo para percorrer a corrente sanguínea e apenas o elemento químico ítrio, liberado pela liga, atingiu o fígado.

O mesmo ocorreu com o elemento químico alumínio proveniente das partículas da liga Ti6Al4V que atingiram o coração. As partículas fabricadas desta liga apresentaram uma variação de tamanho entre 50 e 200 μm , acima dos 10 μm que, segundo a literatura, poderiam percorrer a corrente sanguínea. Para avaliar e verificar como ocorreu a dissociação do metal no tecido é necessária a identificação da afinidade dos íons metálicos com determinados órgãos.

Nenhum indício dos componentes da liga CoCrMo foi encontrado nos tecidos analisados. Devido ao tamanho das partículas em torno de 500 μm , estas, provavelmente, permaneceram encapsuladas no local de aplicação. Como não foi realizada a análise dos tecidos do peritônio, onde foram injetadas as partículas, não é possível confirmar esta suspeita. Alguns estudos identificaram a presença de íons cromo na urina e no sangue de pacientes que sofreram revisão de próteses de quadril (JACOBS *et al.*, 2004; URBAN *et al.*, 2000). Portanto, é possível que a urina e o sangue dos ratos que receberam as partículas de CoCrMo, contivessem íons provenientes da liga. Para a coleta de urina dos ratos, no entanto, são necessárias gaiolas especiais e, devido ao foco deste trabalho estar direcionado para a identificação de lesões nos tecidos dos órgãos, não foram utilizadas tais gaiolas, o que impossibilitou a coleta de urina dos animais. Quanto à análise do sangue, não foi possível encontrar um laboratório que fizesse a identificação de íons metálicos no sangue de ratos.

Apenas no grupo que sofreu injeção de partículas da liga CoCrMo, foram encontradas lesões em dois órgãos no mesmo rato, fígado e pulmão. No entanto,

nenhum componente desta liga foi detectado. Neste caso, os resultados podem ter sido afetados pela sua contaminação, já que foram fabricadas por esmeril. O esmeril é uma pedra dura, formada basicamente de óxido de alumínio, dentre outros materiais, como ferro e silício. Nenhum elemento componente da pedra foi identificado através do EDS.

Neste trabalho, apesar de não-detectada a contaminação pelo EDS, foram observadas lesões em tecidos do fígado em ratos onde foram injetadas partículas da liga CoCrMo, como os achados de Visuri *et al.* (1996) e Fleury *et al.* (2006). O acúmulo desses metais tóxicos no organismo produz grandes alterações celulares, como os granulomas epitelioides por corpo estranho e as células gigantes, alterações estas encontradas neste trabalho (TANAKA *et al.*, 2004).

O granuloma epitelióide de corpo estranho encontrado no grupo controle não tem relação com os metais injetados, pois a solução de Hank não possui os mesmos metais contidos na composição das ligas utilizadas. A solução de Hank (CaCl_2 0,1855g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,204 g/L, KCl 0,4 g/L, K_2PO_4 0,06 g/L, NaHCO_3 0,35 g/L, NaCl 8,00 g/L, Na_2HPO_4 0,0475 g/L, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 1 g/L) possui composição semelhante aos fluídos biológicos e, portanto, não se esperavam reações adversas no grupo controle.

Foram observadas poucas amostras com lesão em relação ao total de lâminas analisadas.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, foi possível chegar às conclusões apresentadas a seguir.

Por meio da metodologia desenvolvida para a fabricação das partículas metálicas, foi possível obter as partículas de aço inox 316L e da liga Ti6Al4V com geometrias similares e grande variação de tamanho. No entanto, a fabricação de partículas da liga CoCrMo foi inviável com a mesma metodologia devido à sua elevada dureza. Para esta liga, foi utilizado um esmeril, obtendo-se partículas bastante diferentes das demais, maiores e alongadas, o que, com a contaminação do esmeril, pode ter afetado os resultados.

Na análise da microscopia óptica das lâminas preparadas de tecidos de fígado, pulmão, rim e coração dos ratos, foram observadas lesões, como os granulomas de corpo estranho, sido causados pela presença de íons metálicos.

Em um dos ratos pertencentes ao grupo que sofreu a injeção de partículas de aço inox 316L foi verificada a presença de ítrio no tecido do fígado, um elemento que, geralmente, faz parte da composição química do aço inoxidável.

Foi detectada a presença de alumínio no coração, em um dos ratos pertencentes ao grupo da liga Ti6Al4V. Nenhum indício de contaminação pela liga CoCrMo foi encontrado e este resultado pode estar vinculado ao tamanho das partículas bem superiores aos das demais ligas, o que, provavelmente, ocasionou o seu encapsulamento na região de inserção.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os resultados encontrados, trabalhos futuros poderiam contribuir para o entendimento dos efeitos sistêmicos causados pela presença da prótese metálica por meio da preparação de mais amostras de tecidos dos órgãos, abrangendo um campo maior de análise.

Microscopia eletrônica de varredura nas amostras pode identificar o tamanho das partículas presentes em cada órgão, de forma a se relacionar o tamanho com o órgão onde houve o acúmulo. Também por meio do MEV em um número maior de amostras podem-se correlacionar os elementos químicos e as suas preferências pelos órgãos.

Exames de sangue e de urina podem auxiliar nas conclusões sobre tamanhos de partículas expelidas e carregadas pela corrente sanguínea. Além disso, uma análise histológica dos tecidos adjacentes à injeção das partículas pode mostrar as lesões ocasionadas nos mesmos e o MEV pode mostrar o tamanho de partícula que permanece encapsulado no local de inserção.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM F750-87 (2002): **Medical Devices and Services. Standard Evaluating Material Extracts by Systemic Injection in the mouse.** vol. 13.01, 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM F75-01: **Cobalt-28 Chromium-6 Molybdenum Alloy Castings and Casting Alloy for Surgical Implants.** vol.13.01, 2001.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM F 1108-04: **Titanium-6Aluminum-4Vanadium Alloy Castings for Surgical Implants.** vol.13.01, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM 138-03: **Wrought 18Chromium-14Nickel-2.5Molybdenum Stainless Steel Bar and Wire for Surgical Implants.** vol.13.01, 2003.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semm in immunol**, v.20, n.2, p.86-100, 2008.

ATLAS DE MICROSCOPIA. **Sistemas de defesas.** Disponível em: <<http://www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/mic0016.htm>>. Acesso em: 24 mar. 2009.

BOARDMAN, D. R. *et al.* A benign psoas mass following metal-on-metal resurfacing of the hip. **J Bone Jont Surg (British)**,v.88B, n.3, p.402-404, 2006.

BROWNE, M.; GREGSON, P. J. Effect of mechanical surface pre-treatment on metal ion release. **Biomaterials**, n. 21, p. 385-392, 2000.

CASE, C.P.; LANGKAMER, V.P; JAMES, C.; PALMER, M.R.; KEMP, A.J. Widespread dissemination from metal debris from implantans. **Bone Joint Surg, (British)**, v.76B, n.5, p.701-712, 1994.

CHOI, M. G; KOH, H. S.; KLUSS, D.; O'CONNOR, D.; MATHUR, A.; TRUSKEY, G. A.; RUBIN, J.; ZHOU, D. X. F.; SUNG, K. L. P. Effects of Titanium Particle Size on Osteoblast Functions in vitro and in vivo. **PNAS**. v.12, n.102, p.4578-4583, 2005.

DEL RIO, J.; BEGUIRISTAIN, J.; DUART, J. Metal levels in corrosion of spinal implants. Department of Orthopedic Surgery and Traumatology. **Eur Spine J**, n.16, p.1055-1061, 2007.

DIAS, F. M. S.; CÂNDIDO, L. C. Efeito da acidez na estabilidade da camada passiva de aços inoxidáveis em soluções contendo íons cloretos. **Tecn Metal Mat**, v.4, n.4, p.43-46, 2008.

DINATO, J. C. Implantes osseointegrados. Cirurgia e Prótese. **Congresso Internacional da Academia Latino-Americana de Osseointegração**. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

DORAN, A.; LAW, F. C.; ALLEN, M. J.; RUSHTON, N. Neoplastic transformations of cells by soluble but not particulate of metals in orthopaedic implants. **Biomaterials**, v.7-9, n.19, p.751-759, 1998.

FLEURY, C.; PETIT, A.; MWALE, F.; ANTONIOU, J.; ZUKOR, D. J.; TABRIZIAN, M.; HUK, O. L. Effect of Cobalt and Chromium Ions on Human MG-63 Osteoblasts in Vitro: Morphology, Cytotoxicity, and Oxidative Stress. **Biomaterials**, v.18, n.27, p.3351-3360, 2006.

FINET, B.; WEBER, G.; CLOOTS, R. Titanium release from dental implants: an in vitro study on sheep. London, **Mater Letters**, n.43, p.159-165, 2000.

FONSECA, K. B.; PEREIRA, H. H.; SILVA, S. N. Avaliação de falhas e implantes metálicos coxo-femoral e joelho retirados de pacientes. **Matéria, Coronel Fabriciano**, MG, v.3, n.10, p.472-480, 2005.

GENTIL, V. **Corrosão**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de patologia geral**. São Paulo: Santos, 1997.

HANAWA, T. Metal ion release from metal implants. **Mat Sc Eng:C**, v.24, n.6-8, p.745-752, 2004.

HEFFERNAN, E. J.; ALKUBAIDAN, F. O.; NIELSEN, T. O.; MUNK, P. L. The imaging appearances of metallosis. **Skeletal Radiol**, v.1, n.37, p.59-62, 2007.

HELMUT, S. Metal ions in biological systems – concepts on metal toxicity, vol 20, cap.2, p. 22-50, 1986.

ISRAEL, M. S.; CONDE, D. C.; KALAOUN, R.; DIAS, E. P. Granuloma periférico de células gigantes - revisão de literatura e relato de um caso. **Rev. Bras Pat Oral**, 2004. Disponível em: <<http://www.patologiaoral.com.br/texto67>>. Acesso em: 24 mar. 2009.

ITO, S.; MATSUMOTO, T.; ENOMOTO, H.; SHINDO, H. Histological analysis and biological effects of granulation tissue around loosened hip prostheses in the development of osteolysis. **J Orthop Sc**, v.9, n.5, p.478-487, 2004.

JACOBS, J. J.; SKIPOR, A. K.; CAMPBELL, P. A.; HALLAB, N. J.; URBAN, R. M.; AMSTUTZ, H. Can metal levels be used to monitor metal-on-metal hip arthroplasties? **J Arthrop**, v.8, n.19, p. 59-65, 2004.

KALBACOVA, M.; ROESSLERV, S.; HEMPELA, U. The Effect of Electrochemically Simulated Titanium Cathodic Corrosion Products on ROS Production and Metabolic Activity of Osteoblasts and Monocytes/Macrophages. **Biomaterials**, v.22, n.28, p. 3263-3272, 2007.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**, v.4, n.23, p. 518-522, 2000.

KREIBICH, D. N.; MORAN, C. G.; DELVES, H. T.; OWEN, T. D.; PINDER, I. M. Systemic Release of Cobalt and Chromium after Uncemented Total Hip Replacement. **J Bone and Joint Surg**, v. 1, n. 78B, p.18-21, 1996.

LUGOWSKI, S. J.; SMITH, D. C.; MCHUGH, A. D.; LOON, V. Release of metal ions from dental implant materials in vivo: determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V and Ti in organ tissues. **J Biomed Mater Res**, n.25, p.1443-1458, 1991.

MEYERS, S. R.; KHOO, X.; HUANG, X.; WALSH, E. B.; GRINSTAFF, M. W.; KENAN, D. The development of peptide-based interfacial biomaterials for generating biological functionality on the surface of bioinert materials. **Biomaterials**, v.3, n.30, p.277-286, 2008.

MORAIS, L. S.; GUIMARÃES, G. S.; ELIAS, C. N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial**, v.6, n.12, p. 48-53, 2007.

MUDALI, U.; SRIDHAR, T. M.; RAJ, B. Corrosion of bio implants. Metallurgy and Materials Group, **Indira Gandhi Centre for Atomic Research**, v. 28, n. 3-4, p.601-637, 2003.

MULLER, F.; HAGYMÁSI, M.; GREIL, P.; ZEILER, G.; SCHUH, A. Transfer of metallic debris after dislocation of ceramic femoral heads in hip prostheses. **Department of Materials Science. Arch Orthop Trauma Surg**, v.3, n.126, p.174-180, 2006.

OREFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais – Fundamentos & Aplicações**. Rio Janeiro, Cultura Médica, 2006.

OLMEDO, R. L.; DUFFO, G.; CABRINI, R. L.; GUGLIELMOTTI, M. B. Local effect of titanium implant corrosion: an experimental study in rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.37, n.11, p.1032-1038, 2008.

PEREIRA, M. L.; ABREU, A. M.; SOUSA, J. P.; CARVALHO, G. S. Chromium accumulation and ultrastructural changes in the mouse liver caused by stainless steel corrosion products. **J Mat. Sc.: Sc in Med**, v.9, n.6, p.523-527, 1995.

POURBAIX, M. **Atlas d'Équilibres Electrochimiques**. Gauthier-Villars, Paris, 1963.

RAE, T. Study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages in vitro. **J. Bone Joint Surg.**, v.57, n.4, p.444-450, 1975.

REVELL, P.A.; AL-SAFFAR, N.; KOBAYASHI, A. Biological reaction to debris in relation to joint prostheses. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: **J Eng in Med**, vol. 211, n. 2, p.187-197, 1996.

RIFFARD, F.; BUSCAIL, H.; CAUDRON, E.; CUEFF, R.; ISSARTEL, C.; PERRIER, S. In-Situ Characterization of the oxide scale formed on yttrium-coated 304 stainless steel at 1000 °C. **Elsevier Science**, Le Puy-en-Velay, 2002.

RUBIO, J. C.; GARCIA-ALONSO, M. C.; ALONSO, C.; ALOBERA, M. A.; CLEMENTE, C.; MUNUERA, L.; ESCUDERO, M. L. Determination of metallic traces in kidneys, livers, lungs and spleens of rats with metallic implants after a long implantation time. **J. Mater Sci: Mater Med**, n. 19, p. 369-375, 2007.

RYAN, G.; PANDIT, A.; APATSIDIS, D. P. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. **Biomaterials**, v. 13, n. 27, p. 2651-2670, 2005.

SANTOS, K. R. P.; MENDONÇA, J. S.; TEIXEIRA, V. W.; TEIXEIRA, A. A. C. Influência da Ausência de Luz Sobre o Ciclo Estral de Ratas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.1, n.70, p.21-23, 2003.

SCHLIEPHAKE, H.; REISS, G.; URBAN, R.; NEUKAM, F. W.; GUCKEL, S. Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible. An experimental study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.5, n. 8, p.502-511, 1993.

SRIVASTAVA, A. K. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. **Mol Cell Biochem**, v.206, n 1-2, p.4573-4919, 2000.

TANAKA, K.; MORITO, J.; KON, S. Effect of Osteopontin Alleles on β -Glucan-Induced Granuloma Formation in the Mouse Liver. **The Am J of Path**, v.2, n.164, p. 567-575, 2004.

THARANI, R. B. S.; DOREY, J. F.; SCHMALZRIED, P. T. The Risk of Cancer Following Total Hip or Knee Arthroplasty. **J Bone Joint Surg (Am)**, n.83, p.774-780, 2001.

TIMM, L. de L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v.1, n.2, p.231-239, 2005.

TOMIZAWA, Y et al. Corrosion of stainless steel stemal wire after long-term implantation. **J Artif Organs**, v.1, n.9, p.61-6, 2006.

URBAN, M. R.; JACOBS, J. J.; TOMLINSON, J. M. et al. Dissemination of wear Particles to the Liver, Spleen, and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement. **J Bone Joint Surg**, n. 82, p. 457-460, 2000.

URBAN, R. M.; TOMLINSON, M. J.; HALL, D. J.; JACOBS, J. J. Accumulation in Liver and Spleen of Metal Particles Generated at Nonbearing Surfaces in Hip Arthroplasty. **J Arth**, v.3, n.8 suppl 19, 2004.

VIRTANEN, S.; MILOSEV, I.; GOMEZ-BARRENA, E.; TREBSE, R.; SALO, J.; KONTTINEN, Y. T. Review Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions. **Acta Materialia Inc**. Published by Elsevier Ltd, v.4, n.3, p.468-476, 2008.

VISURI, T.; PUKKALA, E.; PAAVOLAINEN, P. et al. Cancer Risk After Metal on Metal and Polyethylene on Metal Total Hip Arthroplasty. **Clin Orth Rel Res**. n.329 Suppl, p.S280-289, 1996.

WISE, D. I. **Biomaterial and Bioengineering Handbook**. Marcel Dekker, Inc., 2000.

WISE, J. P.; WISE, S. S.; LITTLE, J. E. The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. **Mut Res/Genet Toxic Environ Mutag**, v.517, n.1-2, p.221-229, 2002.

WOODMAN, J. L.; JACOBS, J. J.; GALANTE, J. O.; URBAN, R. M. Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study. **J. Orthop. Res. Hoboken**, n.1, p.421-430, 1984.

YANG, I. H.; KIM, S. Y.; RUBASH, H. E.; SHANBHAG, A. S. Fabrication of Submicron Titanium-Alloy Particles for Biological Response Studies. Fabrication of submicron titanium-alloy particles for biological. **J Biomed Mat Res Part B: Applied Biomaterials**, v.3, n.48, p.220-223, 1998.

YOKEL, R. A. The toxicology of aluminum in the brain: a review. **Neurotoxicology**, v.21, n.5, p.813-828, 2000.

ANEXO A – LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 29 de novembro de 2006.

PARECER N. 81.06/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética No Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em reunião realizada no dia 27 de novembro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Estudo da localização e acúmulo de partículas metálicas em órgãos de ratos", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 186

O experimento classificado como de categoria C , será realizado com o número de 45 Ratos Wistar os quais após o experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Antonia Maria Binder Prado

Presidente do Comitê de Ética No Uso de Animais da PUCPR

Ilma Sra

Silvia Helena M. S. Gierts

APÊNDICE A – QUADRO CONTENDO AS MASSAS DOS RATOS ANTES DO PROCEDIMENTO DE INJEÇÃO

Grupo CoCrMo	Grupo Aço Inox 316L	Grupo Ti6Al4V	Grupo Sol. Hank	Grupo Reserva
Rato 1: 356g	Rato 1: 348g	Rato 1: 316g	Rato 1: 294g	Rato 1: morto
Rato 2: 294g	Rato 2: 338g	Rato 2: 328g	Rato 2: 258g	Rato 2: 328g
Rato 3: 308g	Rato 3: 314g	Rato 3: 276g	Rato 3: 324g	Rato 3: 314g
Rato 4: 284g	Rato 4: 342g	Rato 4: 306g	Rato 4: 336g	Rato 4: 312g
Rato 5: 304g	Rato 5: 336g	Rato 5: 314g	Rato 5: 266g	Rato 5: 300g
Rato 6: 308g	Rato 6: 298g	Rato 6: 334g	Rato 6: 284g	
Rato 7: 294g	Rato 7: 302g	Rato 7: 262g	Rato 7: 286g	
Rato 8: 296g	Rato 8: 372g	Rato 8: 274g	Rato 8: 314g	
Rato 9: 294g	Rato 9: 350g	Rato 9: 274g	Rato 9: 326g	
Rato10:324g	Rato10:344g	Rato10:364g	Rato10:morto	