

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

***“O papel das interações químicas entre tório, cério e lantânio em toxicidade de linfócitos e osteoblastos humanos”***

*por*

***Monica Stuck de Oliveira***

*Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.*

*Orientadora principal: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula de Novaes Sarcinelli*

*Segundo orientador: Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho*

*Rio de Janeiro, abril de 2013.*

*Esta tese, intitulada*

***“O papel das interações químicas entre tório, cério e lantânio em toxicidade de linfócitos e osteoblastos humanos”***

*apresentada por*

***Monica Stuck de Oliveira***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Vitória de Moura Gallo

Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ariane Leites Larentis

Prof. Dr. Sergio Rabello Alves

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula de Novaes Sarcinelli – Orientadora principal

*Tese defendida e aprovada em 10 de abril de 2013.*

Catálogo na fonte

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica

Biblioteca de Saúde Pública

O48 Oliveira, Monica Stuck de  
O papel das interações químicas entre tório, cério e  
lantânio sobre a toxicidade em modelos de linfócitos T  
e osteoblastos humanos. / Monica Stuck de Oliveira. --  
2013.

xiii, 100 f. : il. ; tab. ; graf.

Orientador: Sarcinelli, Paula Novaes  
Silva Filho, Fernando Costa e

Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde  
Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2013.

1. Toxicologia. 2. Linfócitos T. 3. Osteoblastos. 4.  
Interações Químicas. I. Título.

CDD – 22.ed. – 615.9

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus filhos Bernardo e Julia por terem me apoiado sempre e por terem tido tanta paciência. Foram quatro anos em que os papéis se inverteram...

À minha irmã e minha mãe por estarem sempre dispostas a ouvir meus desabafos e histórias sobre esse trabalho e ajudarem muito com todas as outras funções não acadêmicas.

Aos meus excepcionais orientadores Paula Sarcinelli e Fernando Costa e Silva Fo., pelo que me ensinaram, pelas oportunidades e pelo apoio emocional, sempre!

Aos professores muito especiais que fizeram a diferença: Fernando Teles, Célia Leitão e Claudia.

Aos colegas do IRD que estavam sempre presentes e ajudando muito com informações, boas discussões, material de laboratório e amizade: Ana Letícia, Camila, Claudia, Geiza, Luca, Marcelo, Max, Sueli, Vallim e Wanderson e todos os membros do “papo no cafezinho”.

Às minhas recentes colegas/amigas com quem convivi no Laboratório de Bioengenharia de Sistemas da UFRJ. Aprendi muito com Lilian, Débora, Thelma, Kassia e Camila.

Aos colegas de curso que foram tantos... em particular as boas parcerias com Cleber e Alessandra,

Aos meus amigos de cinema, caipirinha e muita conversa, que mesmo nos meus sumiços não deixaram de dar um alô e tentar um novo convite.

## RESUMO

A exposição de trabalhadores a tório (Th), cério (Ce) e lantânio (La), nas áreas de mineração e extração, é tratada apenas sob o ponto de vista da exposição e incorporação do Th por se tratar de elemento radioativo. No caso específico da exposição humana aos elementos encontrados em minérios, donde se extraem estes metais, as informações disponíveis na literatura sobre a toxicologia química não nos permitem antever, com segurança, o potencial dos mesmos em provocar danos à saúde. A questão do efeito das misturas de Th, Ce e La é um aspecto ainda menos explorado, mas de extrema importância. O tema desta tese foi a pesquisa *in vitro* dos efeitos de Th, Ce e La sobre modelos de linfócito T (linhagem Jurkat) e osteoblastos (linhagem MG63) humanos, testados sob a forma simples e em combinações. Como indicadores de efeito foram utilizadas medidas de viabilidade e proliferação, adesão celular, síntese de fosfatase alcalina e osteocalcina. Foram utilizados métodos colorimétricos e leituras em hematocítômetro, microscopia de fluorescência e espectrofotômetro. Na avaliação da exposição às misturas foi testada a hipótese de não interação entre os metais através da abordagem de Loewe e do modelo matemático de Chou (Compusyn). Observou-se que células Jurkat em presença de Th e Ce, de forma isolada, não sofreram efeitos tóxicos e que o La gerou redução na proliferação celular. Quanto à linhagem MG63 foi observado que a exposição de células aos três metais gerou curvas dose-efeito em forma de sino mostrando que os efeitos sobre a proliferação podem ser de ativação ou inibição de acordo com as doses utilizadas. Os indicadores de diferenciação celular sugerem que, nas concentrações mais elevadas, os três metais, e mais fortemente Ce e La, foram capazes de estimular a diferenciação de osteoblastos expressa pela síntese aumentada de fosfatase alcalina e osteocalcina. Os lantanídeos também interferiram no processo de adesão dos osteoblastos ao substrato. Tanto para células Jurkat como para células MG63 observou-se a existência de interações químicas entre diferentes combinações testadas. Dependendo da mistura e do desfecho avaliado as interações, quando presentes, variaram entre sinergismo e antagonismo. Com relação à exposição das células Jurkat às misturas, os efeitos mostraram a intensificação do efeito do La em presença de Th, que resultou em uma redução na proliferação celular. Observou-se também que o sinergismo foi mais acentuado em presença das concentrações mais baixas dos metais da mistura. Considerando-se o desfecho proliferação relativamente aos osteoblastos, observou-se sinergismo para as combinações (Th+La) e (Th+Ce). Com relação à síntese de fosfatase alcalina observou-se um antagonismo leve para as misturas (Th+Ce) e (Ce+La) e para

síntese de osteocalcina observou-se um forte antagonismo em todas as combinações binárias utilizadas. Futuras pesquisas poderão ser delineadas reunindo diferentes abordagens como estudos *in vitro*, *in vivo*, epidemiológicos e de modelagem. Há uma forte indicação de que a densidade óssea possa ser um possível indicador de efeito para exposições desse tipo.

**PALAVRAS-CHAVE:** interações químicas; toxicologia; linfócitos T; osteoblastos.

## ABSTRACT

The subject on mining and extraction of thorium (Th), cerium (Ce) and lanthanum (La) is dealt only under the point of view of workers exposure and incorporation of Th because it is a radioactive element. In the specific case of human exposure to elements in ores, from which these metals are extracted, data on their chemical toxicology are not sufficient to predict with certainty its potential in causing health damages. The issue on the effect of mixtures containing Th, Ce and La is even less explored, but extremely important. The objective of this thesis was to study the role of chemical interactions between Th, Ce and La in lymphocyte and osteoblast toxicity. Deviations on proliferation index (lymphocytes and osteoblasts), cell adhesion, alkaline phosphatase and osteocalcina synthesis (osteoblasts) were used as biomarkers. Colorimetric methods were used and analyses were completed in hemocytometer, fluorescence microscopy and spectrophotometer. The exposure of cells to mixtures was evaluated through the hypothesis of no interaction between metals, tested through the method of Loewe and the mathematical model of Chou (Compusyn). The results indicated that Th and Ce alone had no toxic effects on lymphocytes and that La caused a decrease on cell proliferation. As for the osteoblasts it was observed that the exposure of cells to the three metals had generated bell-shaped dose-effect curves indicating that the effects on proliferation could be of stimulation or inhibition according to the concentrations used. Biomarkers of cell differentiation suggested that, at higher concentrations, the three metals, and more strongly Ce and La, were capable of stimulating differentiation of osteoblasts expressed by the increased synthesis of alkaline phosphatase and osteocalcin. Lanthanides also interfered in the process of osteoblast adhesion to the substrate. For both cells, lymphocytes and osteoblasts, it was identified the existence of chemical interactions among different combinations. Depending on the mix and the biomarker evaluated the interactions varied from synergism and antagonism. Regarding the exposure of lymphocytes to mixtures, the results showed that Th intensified the effect of La reducing cell proliferation. It was also observed that synergism was more evident in the presence of lower concentrations of metals constituting the mixture. Considering proliferation as endpoint, relatively to osteoblasts, synergism was observed for the combinations: (Th + La) and (Th + Ce). With respect to the synthesis of ALP there was a slight antagonism for the mixtures (Th + Ce) and (Ce + La). The synthesis of OC exhibited a strong antagonism on every binary combination used. Future researche might be outlined gathering different

approaches such as *in vitro* and *in vivo* studies, epidemiological studies and mathematical modeling. There is a strong indication that bone density may be a possible marker of effect to such exposures.

**KEYWORDS:** chemical interactions; toxicology; T lymphocytes; osteoblasts.



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	IV
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABELAS .....	XIII
SIGLAS .....	XIV
1 Introdução.....	2
1.1 Os elementos tório, cério e lantânio.....	2
1.2 Relevância econômica .....	3
1.3 Relevância biológica.....	5
1.3.1 Cultura de células .....	10
1.3.2 Bioindicadores.....	11
1.3.3 Misturas químicas.....	13
1.4 Objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo Geral .....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16
2 Material e métodos .....	17
2.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	17
2.2 Cultura de células.....	17
2.3 Manutenção das linhagens celulares.....	17
2.4 Aplicação das substâncias teste .....	18
2.4.1 Ensaio com linhagem Jurkat (modelo de linfócitos T).....	18
2.5 Ensaio com linhagem MG63 (modelo para osteoblastos).....	19
2.6 Avaliação <i>in vitro</i> .....	20
2.6.1 Linhagem Jurkat .....	20
2.6.2 Linhagem MG63 .....	22
2.7 Interações químicas.....	25
2.8 Análise estatística .....	27
3 Resultados.....	28
3.1 Células da linhagem Jurkat .....	28
3.1.1 Análise por Metais.....	28
3.1.2 Interações entre Metais.....	30

3.2	Osteoblastos .....	38
3.2.1	Análise por Metal .....	38
3.2.2	Análise por Desfecho.....	47
3.2.3	Interações entre os Metais .....	57
4	Discussão.....	63
4.1	Células Jurkat.....	63
4.2	Células MG63 .....	64
4.2.1	Tório .....	65
4.2.2	Cério .....	65
4.2.3	Lantânio .....	66
4.2.4	Desfechos .....	67
4.2.5	Interações.....	69
5	Conclusão .....	71
5.1	Considerações finais e perspectivas futuras.....	72
6	Referências .....	74
7	Artigo publicado .....	83

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1- Lantanídeos e Actinídeos – fração da dose injetada e absorvida sobre o esqueleto de ratos 1-8 dias após injeção IP</i> .....	8
<i>Figura 2 – Teste piloto – viabilidade relativa de células MG63 em presença de Th, Ce e La, por 24 horas.</i> .....	19
<i>Figura 3- Viabilidade de células Jurkat, em resposta à incubação com Th, Ce e La.</i> ..	29
<i>Figura 4 - Padrão de morte das células Jurkat, resultante da exposição a misturas compostas por La+Th por 24 horas.</i> .....	31
<i>Figura 5 – Quebras na fita de DNA de células T.</i> .....	32
<i>Figura 6- Curva dose-efeito de viabilidade de células Jurkat (CompuSyn)</i> .....	35
<i>Figura 7- Gráfico do índice de combinação relativo à viabilidade de células Jurkat.</i> .	36
<i>Figura 8- Isoblograma normalizado (CompuSyn), relativo à proliferação de células Jurkat, para combinações com razão não constante.</i> .....	37
<i>Figura 9 - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com Th, analisada por MTT e expressa em valores de absorbância (A)</i> .....	38
<i>Figura 10 - ALP sintetizada por células MG63 expostas a Th</i> .....	39
<i>Figura 11 - OC sintetizada por células MG63 expostas a Th, por 7 dias.</i> .....	40
<i>Figura 12 - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com Ce,</i> .....	41
<i>Figura 13 – ALP sintetizada por células MG63 expostas a Ce.</i> .....	42
<i>Figura 14 - OC sintetizada por células MG63 expostas a Ce.</i> .....	43
<i>Figura 15 - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com La, analisada por MTT</i> .....	44
<i>Figura 16 - ALP sintetizada por células MG63 expostas a La</i> .....	45
<i>Figura 17 - OC sintetizada por células MG63 expostas a La.</i> .....	46

<b>Figura 18</b> – Adesão de células MG63, após incubação com Th .....	48
<b>Figura 19</b> - Adesão de células MG63, após incubação com Ce.....	49
<b>Figura 20</b> - Adesão de células MG63, após incubação com La.....	50
<b>Figura 21</b> - Imagens ilustrando a evolução no processo de adesão de células MG63 (osteoblastos) à superfície da placa. ....	51
<b>Figura 22</b> - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com Th, Ce e La – gráfico comparativo para os três metais.....	52
<b>Figura 23</b> - Proliferação celular resultante da exposição dos osteoblastos a Th, Ce e La.....	53
<b>Figura 24</b> - Síntese comparativa da enzima ALP por células MG63, em resposta à incubação com Th, Ce e La .....	54
<b>Figura 25</b> - Síntese da enzima ALP após exposição da linhagem MG63 a Th, Ce e La. ....	55
<b>Figura 26</b> - Síntese comparativa da síntese de OC por células MG63, em resposta à incubação com Th, Ce e La. ....	56
<b>Figura 27</b> – Representação gráfica da síntese de OC pelas células MG63. ....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Distribuição geográfica de depósitos de Th .....	5
<b>Tabela 2-</b> Concentração média de Th em material autopsiado de mineiros moradores de duas cidades norte-americanas .....	7
<b>Tabela 3-</b> Curva de crescimento de células Jurkat. ....	20
<b>Tabela 4-</b> Curva de crescimento de células da linhagem MG63. ....	22
<b>Tabela 5-</b> Viabilidade celular relativa observada após exposição de células Jurkat às misturas La+Th e Ce+La+Th, por 24 e 48 horas.....	30
<b>Tabela 6-</b> Índice de Interação de Loewe (IL), relativo à proliferação, para células Jurkat expostos a duas misturas.....	33
<b>Tabela 7 -</b> Índice de Combinação IC relativo à proliferação, obtido pelo programa CompuSyn. Células Jurkat expostos a Th e La e a combinações (La+Th).....	34
<b>Tabela 8-</b> Proliferação relativa dos osteoblastos: relação dose-efeito de Th, Ce e La e respectivas combinações após 7 dias de tratamento (CompuSyn).....	58
<b>Tabela 9-</b> Síntese relativa da enzima ALP por células MG63: relação dose-efeito para Th, Ce e La e respectivas combinações, após 7 dias de tratamento (CompuSyn). ....	59
<b>Tabela 10-</b> Síntese de OC em osteoblastos: concentrações de Th, Ce e La e respectivas combinações que dobram a síntese da proteína (Índice de Loewe).....	62

## SIGLAS

AIEA	Agencia Internacional de Energia Atômica
ALP	fosfatase alcalina
AM	Estado do Amazonas
ANOVA	análise de variância
AO	laranja de acridina
AT	Azul de Tripan
ATCC	banco de células - American Type Culture Collection
BCRJ	banco de células do Rio de Janeiro
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CTR	grupo controle, sem tratamento
DL	dose letal
Dm	dose correspondente a 50% de efeito
DMEM	meio para cultura de osteoblastos - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade ótica
DP	desvio padrão
EB	brometo de etídeo
Fa	fração afetada
GO	Estado de Goiás
HeLa	linhagem de células epitelióides humanos
IC	Índice de Combinação
IL	Índice de Loewe
IP	administração via intraperitoneal

IRD	Instituto de Radioproteção e Dosimetria
m	forma da curva dose-efeito
MG-63	linhagem celular de osteoblastos humanos
MTT	sal reduzido de tetrazol à formazan púrpura
OC	osteocalcina
PBDE	difenil éteres polibromados
RPMI	meio de cultura para modelo de linfócitos - Roswell Park Memorial Institute
PT	proteína total (Total Protein)
USEPA	Agência de Proteção Ambiental Americana

## 1 Introdução

Diante do processo de industrialização e suas consequências, incluindo principalmente a poluição ambiental, a população humana está sujeita a uma série de riscos decorrentes dos diversos agentes potencialmente tóxicos. Neste contexto, estudos voltados aos efeitos de interação entre poluentes e o organismo há muito geram parâmetros finos de aferição e de monitoramento de toxicidade ambiental <sup>1</sup>.

Como a maioria, senão a totalidade, das doenças decorre de distúrbios celulares, busca-se entender os processos de interação entre poluentes e células <sup>2</sup>. As respostas celulares a poluentes químicos incluem alterações na membrana plasmática <sup>3</sup>, na biossíntese molecular, no tráfego intracelular <sup>3,4</sup> e no genoma <sup>5</sup>.

Pesquisas realizadas sobre a interação do chumbo com metais-traço encontrados no sangue <sup>6</sup>, selênio com outros metais contaminantes presentes no organismo <sup>7</sup>, e a contaminação de profissionais expostos a misturas contendo arsênio, cádmio, chumbo e zinco <sup>8</sup> são dos poucos exemplos encontrados que estudaram efeitos de combinações de metais na saúde humana e sinalizaram para a necessidade de dados sobre o efeito de misturas de metais.

No caso específico da exposição do homem aos elementos encontrados na monazita, as informações disponíveis na literatura sobre a toxicologia do Th, do Ce e do La, não nos permitem antever, com a necessária segurança, o potencial dos mesmos em provocar danos à saúde. Em sua maioria, estas informações têm origem em experimentos conduzidos com animais e de estudos epidemiológicos, muitos deles realizados numa época em que não se dispunha do aparato laboratorial hoje encontrado.

### 1.1 Os elementos tório, cério e lantânio

O tório (Th) é um radionuclídeo natural, pertencente ao grupo dos actínídeos, com meia-vida radiológica de 14 bilhões de anos. Trata-se de um elemento radioativo emissor de partículas  $\alpha$  e que apresenta um decaimento muito lento; por isso mesmo é considerado elemento de baixa radioatividade <sup>9</sup>.

O cério (Ce) e o lantânio (La) são elementos do grupo dos lantanídeos, também conhecidos como “terras raras”, e representam um grupo constituído por 15 elementos,



do La ao lutécio. Em realidade não se tratam de metais verdadeiramente raros mas sim muito parecidos em termos físico-químicos e por isso difíceis de serem distinguidos. Estão presentes na litosfera de forma relativamente abundante quando comparados a outros metais raros<sup>10</sup>. Na tabela periódica ocupam a posição IIIb. Dentre os lantanídeos, o Ce é o elemento mais abundante e faz parte da composição de diversos minerais. Já o La é naturalmente encontrado em minerais associados ao Ce<sup>11</sup>.

Monazita é o minério mais importante e abundante como fonte destes três metais, encontrando-se em depósitos localizados em vários países. Trata-se de um metal de fácil exploração, em minas abertas, e a presença de Th associado à rede cristalina do mineral faz com que os processos de mineração e extração estejam sujeitos às normas de radioproteção da Comissão Nacional de Energia Nuclear<sup>12</sup>.

As reservas de monazita litorâneas foram exploradas até meados dos anos 1990. Por conter elementos radioativos, o aproveitamento da monazita para a obtenção de terras-raras foi descartado. As reservas atuais localizam-se nos estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro. O país dispõe de reservas minerais significativas localizadas nos municípios de Presidente Figueiredo, AM e de Catalão, GO<sup>13</sup>.

## **1.2 Relevância econômica**

Sobre o Ce e o La, o governo brasileiro pretende consolidar um programa de pesquisa e desenvolvimento para minerais estratégicos, entre eles os lantanídeos. Para isso, aspira retomar a atividade num segmento (metais terras raras) em que o País já foi líder global mas que hoje participa com menos de 1% da produção mundial. O Brasil se dispõe a entrar em um riquíssimo mercado dominado pela China e que é fonte de matéria prima para a produção de ligas metálicas usadas em aparelhos de alta tecnologia, como laptops e mísseis. Atualmente a China controla 97% do mercado global de metais terras raras. Em virtude de tal monopólio, em 2010 o preço da tonelada exportada destes metais, antes cotada a US\$ 5 mil, chegou aos US\$ 50 mil<sup>14</sup>. La e Ce são, também, economicamente importantes por suas conhecidas aplicações tanto na clínica médica quanto na pesquisa biomédica<sup>15</sup>.

O tório, por sua vez, tem nos reatores nucleares, como elemento combustível, uma de suas aplicações mais importantes. Na área nuclear sua aplicação encontra-se sob exame em vários países, sendo que na Índia e na China já é utilizado em reatores de quarta geração, conforme documento da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) <sup>16</sup>.

Estima-se que dentro de alguns anos o Th possa vir a se tornar o principal elemento combustível nuclear. As reservas de Th são três a quatro vezes mais abundantes que as de urânio (U), podendo ser encontradas em diversas partes do mundo (Tabela 1), e em condições de fácil extração. Acrescenta-se ainda que os subprodutos do Th, após esgotamento como combustível, são de manejo mais seguro que os do U em termos de segurança radiológica <sup>16</sup>

**Tabela 1-** Distribuição geográfica de depósitos de Th

<b>PAÍS</b>	<b>RESERVAS ATUAIS</b>	<b>RESERVAS ESTIMADAS</b>
	<b>(toneladas)</b>	
<b>Austrália</b>	19.000	-
<b>África do Sul</b>	18.000	-
<b>Brasil</b>	<b>606.000</b>	<b>700.000</b>
<b>Canadá</b>	45.000	128.000
<b>Egito</b>	15.000	309.000
<b>EUA</b>	137.000	295.000
<b>Groenlândia</b>	54.000	32.000
<b>Índia</b>	319.000	-
<b>Noruega</b>	132.000	132.000
<b>Turquia</b>	380.000	500.000
<b>Outros países</b>	505.000	-
<b>TOTAL MUNDIAL</b>	<b>2.230.000</b>	<b>2.130.000</b>

Fonte: AIEA (2005).

Importante mencionar que o Th está presente como produto secundário na extração de diversos metais de valor econômico, tais como Ni, U e Zr <sup>11</sup> e que também é utilizado na indústria de iluminação e em ligas metálicas.

Até a década de 1960, o *Thorotrast* – solução coloidal de dextrina e dióxido de tório – era utilizado como contraste em radiodiagnóstico, mas seu uso foi interrompido devido ao potencial carcinogênico desta solução <sup>17</sup>.

### **1.3 Relevância biológica**

Para o homem Th, La e Ce são microcontaminantes ambientais, osteotrópicos, incorporados principalmente via inalação e ingestão de alimentos. Metais com afinidade pelo tecido ósseo se inserem na matriz mineral ou formam coloides que são adsorvidos à mesma <sup>18,19</sup>. Assim, pode-se dizer que o esqueleto humano representa importante potencial de armazenamento para tais elementos.

No ambiente de trabalho, estas substâncias podem ser consideradas misturas complexas, constituindo-se um dos maiores riscos ocupacionais para a saúde e segurança dos trabalhadores se levarmos em conta o efeito das misturas resultantes. Muitos metais que não apresentam funções biológicas conhecidas e não são essenciais podem apresentar potencial tóxico.<sup>20</sup> A toxicidade desses metais pode ocorrer através da indução de estresse oxidativo, inibição dos sistemas de reparo de DNA ou por interferência no sistema de proliferação celular<sup>21</sup>. Estudos epidemiológicos com distintas abordagens têm sido amplamente utilizados com o objetivo de examinar a associação entre exposição à poluição do ar e seus efeitos sobre a saúde. A grande vantagem destes estudos está no fato de avaliarem a exposição ambiental total a que os indivíduos estão expostos<sup>22</sup>.

A concentração de Th no sangue de trabalhadores de mineradoras é superior àquela encontrada em grupos controle<sup>23,24</sup>. Entretanto, sua toxicidade é considerada baixa visto que *in vivo* ele tende a formar complexos inertes<sup>25,26</sup>. Outra pesquisa de coorte realizada com 273 homens que trabalhavam em uma unidade de processamento de areia monazítica, expostos a Th e outros lantanídeos, mostrou elevação nos níveis de aspartato globulina, aminotransferase e bilirrubina total no soro. Estas alterações foram atribuídas ao efeito radiológico do Th. Embora as alterações hepáticas tenham sido atribuídas a efeitos da radiação decorrente da incorporação do Th, seu efeito químico, bem como dos lantanídeos presentes, não foi descartado pelos autores<sup>24</sup>.

Nem sempre é possível separar o papel de diferentes fatores ambientais. Chen e colaboradores (2005) realizaram estudo epidemiológico em trabalhadores da mina de Bayun Obo, na China. O estudo revelou níveis significativamente elevados de mortalidade por câncer de pulmão tanto em trabalhadores envolvidos na extração como naqueles não expostos à poeira<sup>27</sup>. A alta taxa de mortalidade e de câncer de pulmão nos trabalhadores da tal mina foi atribuída aos altos níveis de consumo de cigarros; a taxa mais elevada encontrada para os mineradores expostos à poeira com relação aos não expostos foi atribuída à inalação de sílica, poeira contendo Th e Rn<sup>27</sup>.

Outro estudo epidemiológico, realizado na década de 1980, diz respeito à análise de biópsias de tecidos de ex-trabalhadores de minas de Th. Este estudo revelou que linfonodos, fígado, ossos e baço são os principais órgãos-alvo para deposição do metal (Tabela 2)<sup>28</sup>.

As amostras obtidas de antigos trabalhadores de Washington DC serviram como controle, uma vez que este grupo não havia sido exposto a Th.

**Tabela 2-** Concentração média de Th em material autopsiado de mineiros moradores de duas cidades norte-americanas

Órgãos	Grand Junction, Colorado		Washington DC grupo controle	
	Amostras analisadas	Th (pCi/Kg)	Amostras analisadas	Th (pCi/Kg)
Pulmão	19	0,58	10	0,32
Linfonodos	14	<b>7,8</b>	10	<b>2,8</b>
Fígado	16	0,03	10	0,05
Rim	17	0,07	8	0,03
Osso	16	<b>0,16</b>	7	<b>0,1</b>
Testículo	44	0,05		
Baço	14	0,09		
Tireóide	1	0,65		

Fonte: Adaptado de Ibrahim et al (1983).

A análise comparativa da cinética de incorporação humana do Th e do U demonstrou que a fração de Th transferida do tecido hematopoiético ao osso é superior à do U, sendo que a meia vida do primeiro no tecido ósseo é maior que a do segundo<sup>29</sup><sup>30</sup>. A incorporação dos metais ao osso de ratos encontra-se resumida na Figura 1 (gráfico reproduzido do artigo publicado por Vidaud et al, 2012).

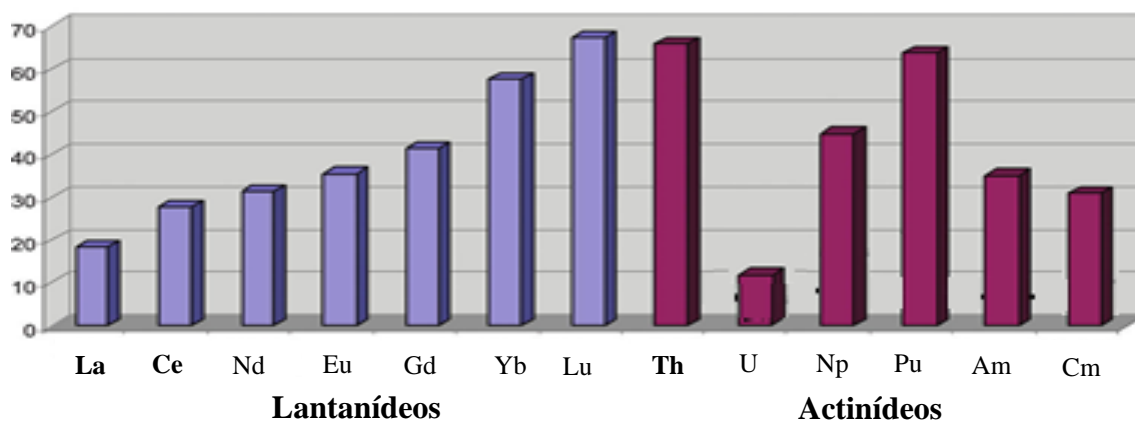


Figura 1- Lantanídeos e Actinídeos – fração da dose injetada e absorvida sobre o esqueleto de ratos 1-8 dias após injeção IP

Fonte: Adaptado de Vidaud et al (2012).

A administração de Ce e La por via intravenosa em cachorros da raça *beagle* revelou que aproximadamente 27 e 18% destes elementos, respectivamente, são retidos no osso e que a meia vida biológica do Ce é de aproximadamente 10 anos<sup>31</sup>.

Os diferentes eventos que levam à acumulação dos metais nos linfonodos e no tecido ósseo e o impacto subsequente sobre o metabolismo dos respectivos tecidos não são completamente compreendidos. Essa falta de conhecimento é particularmente verdadeira para lantanídeos e actinídeos, cuja utilização tem aumentado nas últimas décadas.

A forte afinidade pelo tecido ósseo demonstrada pelos elementos metálicos foi constatada em estudos do corpo inteiro<sup>29</sup>. Os linfócitos T, por sua vez, são células que entram em contato com os depósitos das formas inertes destes contaminantes junto aos linfonodos e com a fração solúvel dos mesmos presentes na circulação linfóide e sanguínea<sup>32</sup>.

O sistema linfóide consiste em órgãos primários (medula óssea e timo) e secundários (linfonodos, baço, amígdalas e agregados de tecidos linfóides em diversos órgãos). A principal função deste sistema é de proteção ao organismo contra patógenos. Os linfonodos têm como principal função a filtração da linfa<sup>32</sup>. O particulado retido no interior dos linfonodos pulmonares tende, na sua maior parte, a formar depósitos e uma pequena fração se solubiliza e penetra na circulação.

O tecido ósseo, por sua vez, possui dois principais tipos celulares que são os osteoblastos e os osteoclastos. Os osteoblastos são células com formato cúbico ou cilíndrico formando monocamadas, responsáveis pela deposição do osteóide, a matriz orgânica não-mineralizada do tecido ósseo e pelo controle da mineralização subsequente do osteóide. No início do processo de mineralização é produzida a fosfatase alcalina, uma ectoenzima, e, no final do processo da mineralização óssea, é sintetizada a osteocalcina, uma das proteínas não colagênicas<sup>32,33</sup>.

A afinidade de lantanídeos e actinídeos pelo osso parece decorrer da forte semelhança bioinorgânica destes com o Ca<sup>34,35</sup>. A deposição dos lantanídeos na estrutura óssea ocorre principalmente nos canais mais vascularizados de sua superfície interna<sup>36</sup>. Tanto os elementos minerais como os elementos orgânicos da matriz óssea podem mediar a ligação de cátions ao osso e responder pelas interações que ocorrem em nível molecular<sup>29</sup>.

Um trabalho de revisão sobre este assunto publicado por Taylor e Legget (2003) mostrou que actinídeos e lantanídeos, após sua fixação, apresentaram meia vida biológica variando de alguns anos, no caso do U, a praticamente duas décadas no caso do Th<sup>31</sup>. Outra pesquisa, como a realizada com osteoblastos primários explantados do osso de crânio de ratos expostos a várias concentrações de La, mostrou que a exposição *in vitro* de osteoblastos ao metal estimulou a diferenciação celular.<sup>34</sup>

Modelos de osteoblastos são as células frequentemente escolhidas para estudos *in vitro* com metais por desempenharem papel crucial na formação óssea, tanto nas fases orgânica como na mineral. Além do interesse sobre a toxicidade dos elementos, a pesquisa sobre materiais utilizados em implantes ósseos para diversas aplicações cirúrgicas tem crescido e materiais sintéticos têm sido desenvolvidos, tendo em vista sua capacidade de permitir melhor adesão dos osteoblastos e proliferação celular<sup>37-39</sup>.

Linfócitos T, por sua vez, são células frequentemente empregadas para estudos de toxicidade em razão de poderem ser obtidas sem necessidade de biópsias ou autópsias. Conseqüentemente, pesquisas com modelos de linfócitos T e osteoblastos imortalizados vêm há muito sendo utilizadas como modelos celulares de investigação *in vitro* sobre o modo de ação de substâncias teste.

### 1.3.1 Cultura de células

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas no tema proposto para este estudo por reproduzirem *in vitro* a complexidade celular. As células utilizadas podem ser de vários tecidos e a sua escolha decorre dos órgãos-alvo de interesse para a pesquisa. A formação de colônias, adesão celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros passíveis de análise<sup>40</sup>.

Por volta de 1940 o desenvolvimento de estudos de enriquecimento nutricional celular dos meios líquidos e a descoberta dos antibióticos propiciaram experimentos com as culturas celulares, fornecendo a base de diversas pesquisas. No início da década de 1950 foi isolada a primeira linhagem celular humana, denominada HeLa, originária de carcinoma uterino <sup>41</sup>. A partir desta década, no entanto, com o aprimoramento das técnicas de dissecação e desagregação teciduais foi possível a obtenção e a manutenção de células dispersas em cultura. Atualmente, diferentes tipos de cultura são realizados: cultura de órgãos, cultura de tecidos, e cultura de células. Células isoladas do tecido de origem são levadas a aderirem a substratos sólidos, ditos inertes (plástico ou vidro), ou mantidas em suspensão. A manutenção de células isoladas em cultura permite monitoramento das condições ambientais de cultivo (pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e a manutenção da cultura por um período prolongado. Uma das primeiras metodologias descritas para avaliação *in vitro* foi sugerida por Rosenbluth et al. (1965) <sup>42</sup>, que propuseram o teste da biocompatibilidade para avaliar plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. Neste ensaio os materiais eram colocados diretamente sobre uma monocamada de células de mamífero e após 24 horas estas células eram observadas para verificar se havia ou não a presença de algum efeito tóxico.

Durante muito tempo acreditou-se que células normais possuíssem capacidade de se duplicarem indefinidamente. Contudo, sabe-se hoje em dia que a maioria das células de vertebrados para de se dividir depois de determinado tempo em cultura em função da senescência celular por encurtamento progressivo dos telômeros.

As culturas de células passaram a ser classificadas em três grupos: (i) Culturas primárias: após coleta do tecido e isolamento das células, estas são imediatamente utilizadas; (ii) Culturas estabelecidas: depois de dissociadas do tecido as células são



mantidas *in vitro*. Estas células retêm a maioria das características do tecido de origem e apresentam capacidade replicativa finita; e (iii) Culturas transformadas ou linhagens celulares: oriundas de tumores ou imortalizadas através de tratamentos físicos, químicos ou por modificações genéticas. Estas células possuem capacidade replicativa ilimitada. As linhagens celulares são amplamente utilizadas por se manterem indefinidamente em cultura <sup>40</sup>.

O estabelecimento de linhagens celulares, de origem animal, provenientes de diversos tecidos e órgãos e a descoberta do efeito protetor do glicerol e do DMSO (dimetilsulfoxido) sobre as células permitiu que fossem criados bancos de células, facilitando o desenvolvimento de numerosas pesquisas. As linhagens mantidas nestes bancos são avaliadas quanto a sua origem, características e possíveis contaminações com outras linhagens ou por agentes tais como vírus, fungos, bactérias e micoplasma. O *American Type Culture Collection* (ATCC), fundado na década de 1960 foi um dos bancos pioneiros. Atualmente fornece linhagens certificadas, elabora manuais de controle de qualidade onde todos os cuidados para caracterização e manutenção de uma linhagem celular são descritos, realiza testes e caracterização de linhagens. Estes procedimentos podem ser adotados por todos os laboratórios que utilizam as células em pesquisa e em diagnóstico <sup>43</sup>.

### 1.3.2 Bioindicadores

Os métodos toxicológicos *in vitro* são importantes para avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, alterações enzimáticas, dentre outros efeitos benéficos ou deletérios às células. Os bioindicadores, ao sinalizarem alterações no comportamento celular em função das exposições realizadas, fornecem as informações necessárias para a análise de risco biológico. (Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3rd. ed. New York. USA1994.)

A seguir são descritas, de forma sucinta, as principais características dos bioindicadores utilizados neste trabalho:

- Viabilidade, ensaios cujo objetivo é avaliar, em determinado momento, a saúde das células. A medição da viabilidade celular desempenha um papel

fundamental em todas as formas de cultura de células. Às vezes, é o principal objectivo da experiência, tal como em ensaios de toxicidade. Existem diversos métodos para avaliação da viabilidade celular que vão desde o ensaio de exclusão do azul de tripan, que constata a integridade de membrana, a análises altamente complexas realizadas com células individuais.<sup>44</sup>

- Proliferação celular, ensaio que tem por objetivo testar a atividade biológica de um determinado composto avaliando a sua capacidade de influir sobre o crescimento de células (ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 235-331).
- Apoptose ou morte celular programada, processo regulado fisiologicamente que promove a remoção da célula afetada da população. É caracterizada pela fragmentação do DNA, formação de vesículas no núcleo e encolhimento da célula<sup>40</sup>,
- Necrose, processo não fisiológico que ocorre após lesão aguda das células<sup>32</sup>;
- Adesão célula-substrato, processo que começa a ser detectado por observação da cultura ao microscópio. Caso haja complementaridade entre as moléculas da superfície celular com aquelas adsorvidas ao material plástico (poliestireno) da garrafa ou da placa de cultura, as células tenderão a se espalhar sobre o último. Se o revestimento do plástico não estiver apropriado, moléculas séricas poderão a ele se adsorver sem orientação adequada às células (não exposição de algumas seqüências de aminoácidos reconhecidas pelas células). Em decorrência, as células poderão se manter somente adsorvidas sem efetuarem adesão, tendendo a se soltarem do plástico e/ou entrando em apoptose. (Apostila do curso Cultivo de Células Animais e Fundamentos de Fisiologia Celular. Petrópolis DB, Costa e Silva Filho F, Carvalho KP, Ignácio KL e Gil LM. Inst. de Biofísica, UFRJ, 2008.; Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3rd. ed. New York. USA1994.
- Fosfatase alcalina, a principal proteína glicosilada presente no osso. Trata-se de uma enzima ligada à superfície dos osteoblastos que pode também ser detectada livre na matriz mineralizada. A fosfatase alcalina desempenha um papel ainda

indefinido na mineralização do osso <sup>33</sup>. É uma proteína de meia vida longa e, portanto estável. Sua síntese aumenta durante a primeira fase de diferenciação dos osteoblastos <sup>38,39</sup>,

- Osteocalcina, a principal proteína não-colagênica da matriz óssea. Assim como a diferenciação *in vitro* dos osteoblastos está associada ao aumento de atividade de fosfatase alcalina, esta é seguida pela síntese de osteocalcina na fase de mineralização <sup>39</sup>.

### 1.3.3 Misturas químicas

A avaliação de risco, com relação à presença de agentes químicos, constitui um aspecto essencial para a saúde pública tendo em conta a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano <sup>45</sup>. Casos em que uma única variável explica inteiramente um fenômeno são raros. No espaço de trabalho ou no meio ambiente as pessoas estão expostas simultaneamente a diversos agentes físicos e químicos. Levando-se em consideração o uso de remédios, fumo, álcool, conservantes e aditivos, geralmente ocorre múltipla exposição a diferentes agentes, físicos e químicos, que podem interagir ou interferir em cada etapa da toxicocinética e processos toxicodinâmicos <sup>46,47</sup>.

A questão central, em particular para a saúde do trabalhador, está na possibilidade não de que um elemento apenas poderá causar efeitos adversos, mas em como as nossas pesquisas e sistemas preditivos lidam com as exposições reais a misturas complexas de numerosos agentes químicos e físicos, potencialmente tóxicos, encontrados no ambiente <sup>48</sup>.

As substâncias de origem antropogênica ou natural, que compõem uma mistura, podem interagir de diferentes formas, interferindo na absorção, ligação a proteínas, biotransformação e excreção da mistura ou de um de seus elementos isoladamente <sup>49</sup>.

Uma vez no ambiente de trabalho, agentes químicos e físicos constituem misturas complexas e um dos maiores riscos ocupacionais para a saúde e segurança dos trabalhadores. Muitos metais que não apresentam funções biológicas conhecidas e não

são essenciais podem apresentar potencial tóxico<sup>20</sup>. A toxicidade desses pode ocorrer através do deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação ou de interações inapropriadas resultando em complexos com poder de modificar a atividade biológica celular<sup>21</sup>.

Dados da literatura sobre a toxicologia do Th e a dos lantanídeos são insuficientes para que se tenha uma noção clara sobre os efeitos biológicos quando os elementos estão presentes em forma de misturas. Em sua maioria, as pesquisas estão voltadas para a caracterização de substância quimicamente isolada, mas em 1939, Bliss publicou um artigo chamando a atenção para a importância das interações químicas, definindo três categorias clássicas: adição, sinergismo e antagonismo<sup>50</sup>. Bliss era estatístico e publicou este artigo ao examinar o efeito de venenos contra insetos usados na agricultura. Suas conclusões se basearam nos resultados de mortalidade dos insetos onde estes valores poderiam variar de acordo com as misturas.

Em 1986, a agência ambiental norte-americana, Environmental Protection Agency (USEPA), fez referência aos potenciais efeitos de tais misturas para a saúde humana. O primeiro documento sobre o assunto, denominado: Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures, foi publicado em 1986<sup>51</sup> e um suplemento, denominado: Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures<sup>51</sup> foi editado em 2000. O objetivo principal destes documentos foi gerar uma abordagem consistente para avaliar os riscos à saúde da exposição a vários produtos químicos. As avaliações de risco resultantes têm como objetivo auxiliar os tomadores de decisão, caracterizando os riscos de saúde para as condições de exposição de interesse. Apesar da dimensão do problema em prever a capacidade de interação entre substâncias, o assunto pode ser tratado de forma bem-sucedida porque é possível limitar a sua complexidade dando ênfase ao estudo de combinações binárias. Entretanto, o problema ambiental com relação às interações é muito complexo. Em primeiro lugar, as exposições ambientais a poluentes normalmente não se apresentam em combinações binárias, mas sim sob a forma de misturas complexas (por exemplo, cigarro, escapamento automotivo, derivados de petróleo). Adicionalmente, profissionais da área de saúde pública estão preocupados com o grande número de tipos de exposições, em particular aquelas de efeito crônico como o câncer. Estes especialistas se concentram

nos efeitos crônicos que podem não ser aparentes por 20 a 50 anos. Claramente esta é uma área para a qual o foco dos esforços deve ser dirigido <sup>52</sup>.

Para a análise dos efeitos ou desfechos é necessários a definição dos principais termos empregados: *aditividade* significa que duas ou mais substâncias atuam sem nenhuma interação entre elas; *antagonismo* e *sinergismo* acontecem quando o desfecho final é respectivamente mais baixo ou maior do que o esperado. Portanto para estimar a interação entre substâncias é necessário definir o efeito aditivo esperado como termo de comparação para o sinergismo e o antagonismo <sup>53</sup>. Desse modo, a *interação* acontece quando se observa um desvio do efeito esperado <sup>54</sup>.

Em 1957 as interações químicas foram avaliadas através das doses que induziam os mesmos efeitos, denominadas isoboles, conceito introduzido por Loewe <sup>55</sup>. A análise isobolográfica é especialmente útil para ensaios *in vitro* de combinações binárias. Trata-se de uma forma gráfica construída em sistema de coordenadas composta das doses individuais da substância e contendo uma linha reta de aditividade que é utilizado para distinguir interações aditivas de sinérgicas e antagonistas <sup>52,55-57</sup>. Ela fornece uma base para avaliar se as respostas biológicas induzidas por misturas são maiores, as mesmas, ou mais baixas do que o esperado com base nas atividades dos componentes individuais e o conceito de aditividade da dose <sup>58</sup>. Os efeitos aditivos foram definidos por Loewe como a simples soma dos efeitos individuais.

Baseados na lei das massas e através de uma série de deduções e induções matemáticas Chou e Talay criaram algoritmos que foram usados na elaboração de um modelo. Como resultado deste trabalho Chou & Martin (2007) criaram um programa computacional denominado CompuSyn para facilitar a simulação e cálculo automático dos parâmetros a partir dos dados de dose-efeito. Isto permite ao pesquisador expressar de forma compacta as principais características da interação observadas <sup>59</sup>. Trata-se de um processo analítico de resultados que permite a comparação aos obtidos com o modelo de Loewe.

Os elementos químicos utilizados nesta pesquisa são: Th, Ce e La. O valor comercial destes metais tende a crescer fortemente devido às políticas públicas que visam aumentar a produção de lantanídeos no Brasil e à evolução da tecnologia empregada nas novas usinas nucleares com a substituição do urânio pelo Th. Esta

valorização irá gerar condições de exposição crescente de trabalhadores envolvidos em todas as etapas de processamento dos três metais.

A questão que se coloca é: como se comportam biologicamente os modelos de células humanas, linfócitos T e osteoblastos expostos aos três metais?

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo Geral**

Desenvolver, no âmbito da saúde pública, e particularmente da saúde do trabalhador, um modelo de análise que permita a investigação *in vitro* sobre as respostas biológicas de células humanas aos metais: Th, Ce e La, associados e isolados.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos dos metais, em forma isolada sobre a viabilidade de células da linhagem Jurkat;
- Avaliar os efeitos dos metais, em forma isolada sobre a proliferação, adesão a substrato, síntese de ALP e síntese de OC de células da linhagem MG63;
- Analisar as combinações dos 3 metais sobre a viabilidade de células Jurkat;
- Analisar as combinações binárias dos metais sobre a proliferação, adesão a substrato, síntese de ALP e síntese de OC de células da linhagem MG63;
- Obtenção e avaliação das curvas dose-resposta dos três metais sobre todos os desfechos pesquisados;
- Testar a hipótese de não interação entre os metais através do modelo de análise de Loewe e do programa CompuSyn.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Aspectos éticos da pesquisa**

Previamente, face ao uso de células de origem humana, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da ENSP/FIOCRUZ, Parecer nº 216/11, CAAE nº 0233.0.031.031-11.

### **2.2 Cultura de células**

Foram utilizadas células da linhagem Jurkat, modelo de linfócito T, derivado da leucemia de células T humana (ATCC TIB-152™), e células da linhagem MG63, modelo de osteoblastos humanos, derivados de osteosarcoma (ATCC CRL-1427™). As duas linhagens foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, que por sua vez mantém linhagens adquiridas junto ao ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). ATCC é um centro mundial de recursos biológicos, sem fins lucrativos, e uma organização de pesquisa que fornece produtos, serviços técnicos e programas educacionais para organizações privadas, governo e meios acadêmicos.

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Radiobiologia do Instituto de Radioproteção e Dosimetria, IRD e no Laboratório de Bioengenharia de Sistemas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

### **2.3 Manutenção das linhagens celulares**

Os linfócitos T da linhagem Jurkat foram mantidos em garrafas de 25cm<sup>2</sup>, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, BR) contendo penicilina, estreptomicina (100 U / ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina, (Sigma-Aldrich,Br), e 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab,BR).

Osteoblastos da linhagem MG63 foram cultivados em garrafas de 25cm<sup>2</sup> e as células cultivadas em DMEM (Cultilab, Br) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Br), ácido ascórbico (0,05g/L) (Reagen, RJ, Br) até

atingirem aproximadamente 90% de confluência. As monocamadas daí resultantes foram dissociadas por incubação em solução de tripsina-EDTA (2,5mg/ml) (Cultilab, Br) e as células dissociadas foram, então, coletadas por centrifugação, lavadas em DMEM sem soro, e ressuspensas no mesmo meio contendo soro.

As células incubadas em RPMI (linhagem Jurkat) e DMEM (linhagem MG63) foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida de 5% CO<sub>2</sub>. A densidade e a proliferação celulares, antes dos ensaios, foram avaliadas por contagem em câmara hematimétrica <sup>40</sup>, tendo-se utilizado o teste de exclusão com corante azul de tripan (AT) para avaliação da viabilidade.

Antes e após incubação com os metais, combinados ou em sua forma simples, células Jurkat e MG-63 com índices de proliferação  $\geq 90\%$  foram incubadas em soluções de AT (Sigma-Aldrich) ou MTT (Sigma-Aldrich). A quantidade de células coradas foi obtida por contagem em câmara hematimétrica, para AT, e espectrofotômetro para MTT. Em um ou outro caso, com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%),

## **2.4 Aplicação das substâncias teste**

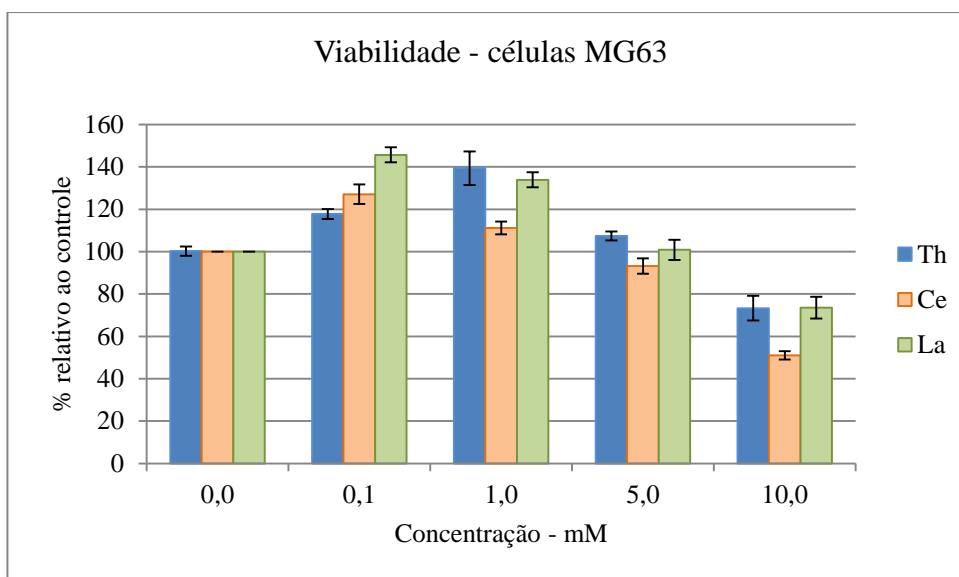
### **2.4.1 Ensaio com linhagem Jurkat (modelo de linfócitos T)**

Ao ensaiar cada elemento separadamente, as concentrações máximas foram de 1,0mM de Th e 5,0mM para Ce e La <sup>60</sup>. Estas foram determinadas com base na manutenção do pH do meio de cultura (semelhante ao pH dos grupos controle). A mistura Th, Ce e La foi adicionada às células de acordo com a razão entre estes elementos detectados em amostras de monazita recolhidas na cidade de Buena (RJ, Brasil). A primeira mistura, Ce + La + Th, foi ensaiada nas concentrações de 0.25+0.12+0.03, 0.50+0.24+0.06, 2.50+1.18+0.30 e 5.00+2.35+0.59 mM, ao passo que a segunda mistura La+Th continha 0.39+0.10, 0.78+0.20, 1.17+0.29, 1.56+0.39, 1.95+0.49 e 2.34+0.59 mM de cada elemento respectivamente.



## 2.5 Ensaios com linhagem MG63 (modelo para osteoblastos)

Após tratamento com os metais na forma isolada, as concentrações utilizadas dos mesmos variaram de 0,0 a 10,0 mM para Th, Ce e La. Quanto às misturas estas foram adicionadas às culturas mantendo fixa a concentração do primeiro metal e variando a concentração do segundo. As misturas foram aplicadas de acordo com as concentrações: 5,0+0,1, 5,0+1,0, 5,0+5,0mM. A diferença nas concentrações utilizadas para os células MG63, relativamente à empregada com células Jurkat, foi determinada em função de nos ensaios piloto a concentração de 5mM apresentar valores de proliferação próximos aos valores do controle e de ser um ponto da curva localizado na vertente indicativa de inibição da proliferação (figura2). Os valores do segundo componente da mistura foram escolhidos dentro da faixa de concentração de 0,1-5mM.



**Figura 2** – Teste piloto – viabilidade relativa de células MG63 em presença de Th, Ce e La, por 24 horas.

## 2.6 Avaliação *in vitro*

Os ensaios descritos foram desenhados e sequencialmente delineados com o objetivo de se investigar possíveis alterações celulares após incubação de células Jurkat e MG63 em meio de cultura contendo Th, Ce e/ou La. Os três metais foram utilizados sob a forma de nitratos. A escolha do nitrato se justifica por ser este sal a forma química de Th mais difundida comercialmente e pelo fato de, dentre nitratos, cloretos e óxidos dos elementos, ser a espécie química menos tóxica a roedores em ensaios já realizados.<sup>61</sup>

### 2.6.1 Linhagem Jurkat

#### *Avaliação da Citotoxicidade*

Para a análise de proliferação células Jurkat foram colocados em cultura a  $5 \times 10^4$  células em frascos de cultura de 25ml. Nos intervalos 24, 48 e 72 horas as células foram contadas com AT. Os ensaios foram realizados em triplicata (Tabela 3).

**Tabela 3-** Curva de crescimento de células Jurkat.

TEMPO (horas)	CONCENTRAÇÃO CELULAR (células/ml)
37°C	
0	$5 \times 10^4$
24	$7 \times 10^4$
48	$1 \times 10^5$
72	$3 \times 10^5$

No decurso dos experimentos as estimativas de necrose, proliferação celular e apoptose foram realizados utilizando-se o ensaio morfológico com laranja de acridina (AO) (Sigma-Aldrich) e brometo de etídio (EB) (Sigma-Aldrich). Este tipo de ensaio é uma maneira de se quantificar células apoptóticas e necróticas dentro da mesma população por meio de microscopia de fluorescência.

As células foram incubadas com um microlitro de uma mistura de 100µg/ml de AO e 100µg/ml de EB em 25µL de cultura de células de cultura em laminas de vidro.<sup>62,63</sup> Células fluorescentes foram observadas e contadas em microscópio Axioplan ZEISS com aumento de 400x. As células foram classificadas com base na morfologia e nas cores apresentadas. Células viáveis apresentavam núcleos verdes com uma aparência normal; as células apoptóticas apresentavam núcleos verdes ou laranja com aparência fragmentada ou condensada; e células necróticas apresentavam núcleos laranja com morfologia normal. 200 células foram contabilizadas, seguindo o protocolo de Wolnicka-Głubisz<sup>64</sup>.

Inicialmente, a toxicidade foi determinada com base em curvas de sobrevivência. As concentrações de metais máximas foram fixadas em função da estabilidade do pH do meio de cultura de células. Portanto, o valor máximo de referência de mortalidade utilizado foi uma dose letal de 30%, DL30. Assim, DL10, DL20 e DL30 foram utilizados para comparar a proliferação celular nas culturas após exposição aos metais, quer isoladamente ou em associação.

#### ***Avaliação da Genotoxicidade***

Potenciais efeitos genotóxicos induzidos foram medidos utilizando-se o ensaio de cometa ou de eletroforese em gel de células individualizadas (SCGE) de forma a identificar quebras na cadeia da fita de DNA. Este ensaio pode ser utilizado para detectar danos na molécula de DNA causados por quebras na cadeia dupla ou simples, sítios lábeis alcalinos, danos de base oxidativos e DNA cross-linking. O ensaio foi realizado sob condições alcalinas (pH13)<sup>65,66</sup>.

As imagens resultantes foram analisadas por avaliação visual com o microscópio de fluorescência. 100 células foram selecionadas por experimento, sendo 50 delas por lamina<sup>66</sup>, e as imagens de cometas foram classificadas em cinco categorias, cada uma representando a relação do tamanho da cauda com relação ao núcleo e, assim, expressando o grau de dano ao DNA<sup>67,68</sup>. O percentual de dano ao DNA foi convertido para unidades arbitrárias<sup>69</sup>. Foram coletadas amostras correspondentes a quatro e 24 horas de exposição aos metais, uma vez que a maior parte das alterações detectadas com este método é considerada de curta duração e rapidamente reparada<sup>70</sup>.

## 2.6.2 Linhagem MG63

### *Proliferação celular*

Para a análise de proliferação celular, osteoblastos foram semeados a  $2,5 \times 10^5$  células em frascos de cultura de 25ml. Após 3, 5 e 7 dias as células foram destacadas com solução de tripsina, coradas com AT e contadas. Os ensaios foram realizados em triplicata (Tabela 4).

**Tabela 4-** Curva de crescimento de células da linhagem MG63.

TEMPO (dias) 37°C	CONCENTRAÇÃO CELULAR (células/ml)
0	$2,5 \times 10^5$
3	$16 \times 10^5$
5	$24 \times 10^5$
7	$31 \times 10^5$

As células osteoblásticas foram coletadas por aspiração, centrifugadas a 200g por 5 minutos e suspendidas novamente em DMEM sem soro. A suspensão de células foi transferidas para placas de 96 poços, a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/ml. Sessenta minutos depois foram acrescidos os metais diluídos em DMEM, em concentrações definidas. Nos poços correspondentes às amostras controle, e contendo as células pré-aplicadas, foi adicionado meio de cultura simples.

O meio original foi substituído por meio DMEM acrescido de ácido ascórbico ( $50\mu\text{g/ml}$ ) para garantir ativação da cadeia respiratória dos osteoblastos. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$  por três e sete dias.

Foi utilizada a técnica de redução do sal de tetrazolium (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente na matriz de mitocôndrias. Esse complexo

enzimático transforma o sal de tetrazolium em produtos finais de metabolização chamados de cristais de formazan que posteriormente são diluídos pelo acréscimo de DMSO. O produto da reação foi então lido a 570nm <sup>71</sup>. Esse ensaio é usado especificamente para a funcionalidade mitocondrial. A quantificação da atividade das mitocôndrias leva indiretamente à quantificação da proliferação da célula<sup>71</sup>.

Foram preparadas alíquotas da solução de MTT a 5mg/mL em PBS, procedendo-se em seguida à incubação das culturas com esta solução a 5% em meio de cultura DMEM, por 4 horas a 37<sup>0</sup>C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, foi adicionado 50µL de DMSO em cada poço e mantida a temperatura ambiente para solubilização completa do precipitado formado para medida colorimétrica em espectrofotômetro. A proliferação celular foi expressa em porcentagem comparativamente ao grupo não tratado.

#### ***Atividade e diferenciação celular***

Ao final de três e sete dias, os sobrenadantes foram recolhidos de todos os poços e centrifugados para remoção de eventuais partículas. Alíquotas dos sobrenadantes foram então distribuídas em criotubos para armazenamento a -80 ° C e analisadas quanto ao conteúdo de proteína total (TP, Total Proteinmicro-Lowry kit, Sigma-Aldrich), fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase Yellow Liquid Substrate System for ELISA, Sigma-Aldrich) e osteocalcina (Osteocalcin ELISA Kit, Invitrogen).

#### ***Proteína Total***

Os ensaios de proteína são ensaios colorimétricos em que a presença de uma proteína provoca uma mudança de cor, proporcional à quantidade de proteína na amostra, que pode ser medida com um espectrofotômetro. Os ensaios de proteína utilizam uma série de diluições de uma proteína conhecida (normalmente albumina de soro bovino), para criar uma curva padrão, a partir da qual a concentração da amostra é derivada. A absorbância da solução é lida pelo comprimento de onda de 595nm. <sup>72</sup>

### ***Fosfatase Alcalina***

O *p*-nitrofenilfosfato é um substrato da fosfatase alcalina utilizado para a detecção da presença desta enzima. Trata-se de um composto incolor. A reação entre a fosfatase alcalina e o *p*-nitrofenilfosfato produz o *p*-nitrofenol que tem coloração amarela e pode ser detectado por absorvância a 405nm.

### ***Osteocalcina***

A osteocalcina é um marcador da presença de osteoblastos maduros. Foram utilizados anticorpos monoclonais dirigidos contra epítomos distintos de osteocalcina humana. Os padrões fornecidos no kit e as amostras reagiram com anticorpos contidos na placa de poços do kit e com anticorpos marcados adicionados em seguida. Após o período de incubação a placa foi lavada com PBS. Enzimas marcadas com os anticorpos foram medidas através de reação cromogênica. A placa foi lida por espectrofotometria. A absorvância é proporcional à concentração de osteocalcina e pode ser lida em espectrofotometro em 405nm.

### ***Adesão celular***

A adesão celular foi avaliada através da atividade mitocondrial das células aderidas, com uso de MTT. Foram usadas placas de 24 poços. Metade do volume total projetado para o ensaio foi preenchido com DMEM contendo os metais em solução. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, por uma hora. Posteriormente o volume final foi completado colocando-se meio de cultura com as células osteoblásticas.

O valor correspondente à absorvância (A), que traduzia a quantidade de células aderidas, foi medido a 60, 120 e 180 minutos pós-adicção das células nos poços. Nos tempos mencionados foram aplicadas alíquotas da solução de MTT a 5mg/mL em PBS, procedendo-se em seguida à incubação das culturas com esta solução a 5% em meio de cultura DMEM, por quatro horas a 37°C, com a placa envolta em papel laminado para proteção da luz, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período,

foram adicionados 50 µL de DMSO em cada poço e mantida a temperatura ambiente para solubilização completa do precipitado formado (cristais de formazan) para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570nm). As concentrações utilizadas para os três metais foram: 0, 0,1 e 1mM. Para cada metal e tempo foram preparadas três réplicas.

## 2.7 Interações químicas

Para a detecção da interação entre dois compostos de uma mistura binária, os efeitos observados foram comparados com dados previstos por modelos de aditividade de Loewe<sup>55</sup> e do programa CompuSyn<sup>73</sup>. Foi necessário trabalhar com apenas uma das vertentes expressas nas curvas dose-resposta. A análise de interações trabalha com um valor de concentração para cada estimativa de efeito.<sup>74</sup> O exame da ação de uma combinação de substâncias químicas necessita de uma curva dose-efeito destas. No caso em que se obtém uma curva em forma de sino ou U, apenas as doses de uma das vertentes do gráfico de cada agente químico são utilizadas nestes cálculos.<sup>75</sup>

Para utilizar o modelo de análise de Loewe as estimativas de interação química foram obtidas com base nos ensaios onde os efeitos dos tratamentos com as concentrações do metal A e do metal B isolados, ou de A e B em combinação produziam o mesmo efeito. A interação foi medida tomando-se o valor do índice de interação que é um marcador quantitativo. O índice de interação, representado por  $\gamma$ , foi definido pela seguinte relação isobolar:

$$[A]_{\text{mix}} / [A] + [B]_{\text{mix}} / [B] = \gamma \quad (1)$$

As variáveis  $[A]$  e  $[B]$  representam as concentrações dos metais utilizados sozinhos, que resultam num efeito específico e as variáveis de  $[A]_{\text{mix}}$  e  $[B]_{\text{mix}}$  são as concentrações das substâncias presentes numa mistura. As quantidades para a fórmula (1) foram obtidas a partir das curvas de dose-resposta das substâncias examinadas por si só ou em misturas. Para a análise isobolográfica, quando  $\gamma = 1$ , a interação é aditiva, quando  $\gamma < 1$ , é sinérgica e quando  $\gamma > 1$ , é antagonista.<sup>56</sup> Existe também uma condição na qual um de dois elementos não gera alterações no desfecho estudado quando utilizado isoladamente, mas intensifica o efeito de outro elemento. Esta condição é descrita como potenciação ou intensificação.

Os mesmos resultados foram também analisados utilizando-se o programa computacional CompuSyn que se tornou um programa livre a partir de agosto de 2012.<sup>76</sup>

As curvas dose-resposta obtidas experimentalmente não apresentaram padrão monotônico e por este motivo os ensaios para estudo da interação foram realizados considerando-se uma concentração fixa do primeiro metal da mistura igual a 5.0mM, somado aos valores de 0.1-1.0 e 5.0mM do segundo metal. A escolha do valor de 5.0mM de concentração, para o primeiro metal da mistura, foi baseada no fato deste valor pertencer à porção da curva correspondente à inibição da proliferação – Figura 22. Dessa forma, as concentrações usadas nas associações foram: 5+0.1, 5+1, 5+5,

Foram avaliados os desfechos para as seis combinações, dois a dois, de Th, Ce e La: Th+La, Th+Ce, Ce+Th, Ce+La, La+Th, La+Ce.

Os resultados obtidos para proliferação e a síntese de fosfatase alcalina foram transformados em percentual relativo ao grupo controle, menos 1. Dessa forma os valores ficaram compreendidos na faixa maior que -1 e menor que 1 e puderam ser analisados utilizando-se o programa CompuSyn. O programa cria novos parâmetros que são por ele utilizados para a análise geral. São eles: (i)  $Dm$ , que significa potência; (ii)  $m$ , que significa a forma da curva dose-efeito ( $m = 1$ , hiperbólica,  $m > 1$ , sigmoide, ou  $m < 1$ , sigmoide plana); e  $r$ , que significa a conformidade dos dados. Os valores de  $Dm$  e  $m$  são usados para o cálculo de Índice de Combinação IC que corresponde a uma medida quantitativa do grau de interação entre substâncias em termos de sinergismo e antagonismo para determinado desfecho<sup>59</sup>.

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{Dm}\right)^m$$

Fa - fração afetada

Fu - fração não afetada

Leva em consideração:

Dm - dose média

m - perfil da curva pelo seu ângulo de inclinação



## **2.8 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas BioEstat 3.0, para as análises dos ensaios realizados com a linhagem Jurkat e SPSS17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL EUA), para a análise dos resultados encontrados nos ensaios com a linhagem MG63. Os experimentos foram realizados em três ensaios. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Após a verificação da normalidade das distribuições e homogeneidade das variâncias, a comparação de médias entre grupos foi feita por ANOVA e teste post hoc de Tukey e, quando os dados não apresentavam distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis. Nas situações em que o pressuposto de homogeneidade das variâncias não tenha sido confirmado, pelo teste de Levene, a comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Games-Howell.

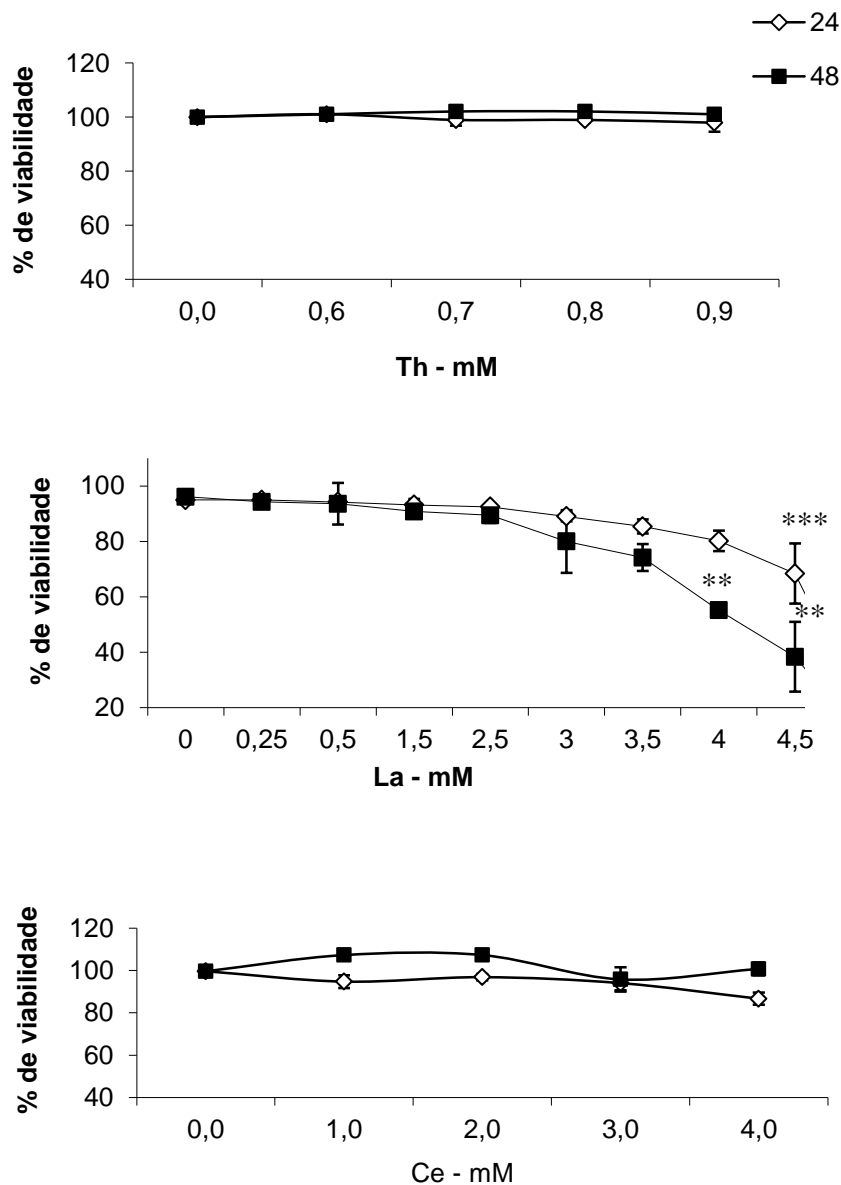
### **3 Resultados**

As concentrações máximas dos nitratos dos metais empregadas variaram de acordo com o meio de cultura utilizado. O meio DMEM utilizado com a linhagem MG63 apresentou um poder de tamponamento maior do que o meio RPMI usado para a linhagem Jurkat. Isso explica os diferentes valores de concentração máxima empregado com cada uma das linhagens.

#### **3.1 Células da linhagem Jurkat**

##### **3.1.1 Análise por Metais**

Os resultados demonstraram que, sob as condições experimentais utilizadas neste estudo, e considerando os metais em sua forma isolada, apenas o La provocou alterações significativas (Figura 3). Para a exposição de 24h, a concentração de 4,5mM apresentou diferença significativa com relação ao controle negativo (CTR) e à concentração de 2,5mM ( $p < 0,0001$ ). Para a exposição de 48 horas, observou-se diferença significativa no valor correspondente à concentração de 4mM comparado ao CTR ( $p < 0,001$ ), e diferença significativa para a concentração 4,5mM relativamente ao CTR e à concentração 0,25Mm ( $p < 0,001$ ). Ao mesmo tempo os valores de viabilidade foram homogêneos relativamente às concentrações de 3,00 a 4,50mM de La. Os dados relativos aos efeitos do La, compreendendo o início deste projeto, foram previamente publicados em artigo <sup>60</sup>.



**Figura 3-** Viabilidade de células Jurkat, em resposta à incubação com Th, Ce e La. Células incubadas por 24 (◇) e 48 (■) horas. Viabilidade avaliada por AT. Cada ponto representa a média ± SD de três experimentos. (\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\* =  $p < 0.0001$ ). Após 24h de exposição, a concentração de 4,5mM mostra diferença significativa vs controle negativo (CTR) e 2,5mM (\*\*\*); Após 48 horas de exposição, há diferença significativa no valor correspondente à concentração de 4mM e CTR (\*\*); observa-se também diferença do desfecho para a concentração 4,5mM vs CTR e a concentração 0,25Mm (\*\*). Ensaio de 24 hr analisado por ANOVA e ensaio 48 hr analisado por Kruskal-Wallis.

### 3.1.2 Interações entre Metais

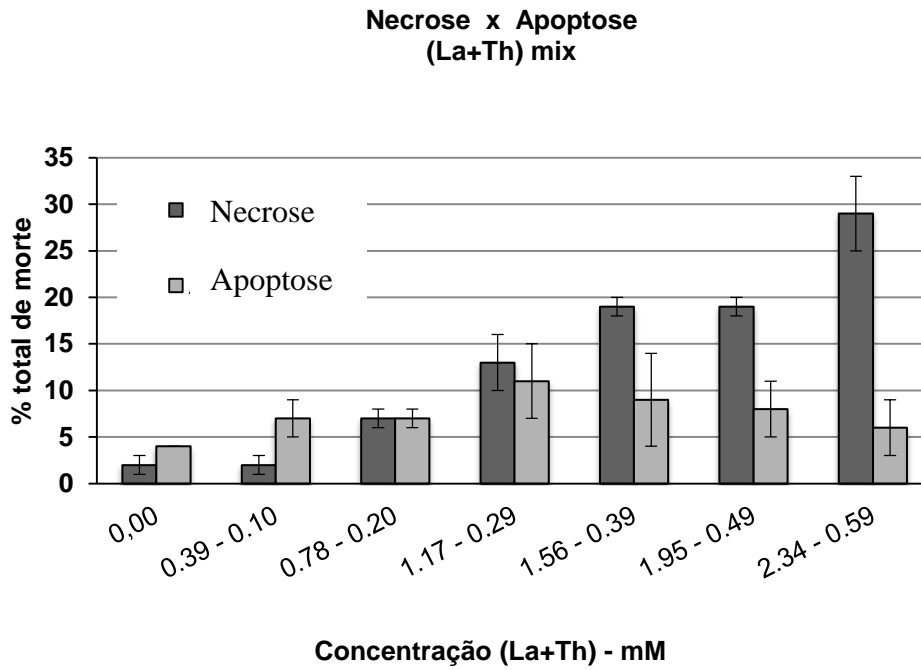
Culturas de células Jurkat tratadas com a mistura Ce+La+Th, na mesma proporção que a encontrada na monazita brasileira não tiveram sua proliferação alterada. No entanto, para a mistura de La+Th observou-se uma inibição significativa da proliferação (Tabela 5).

**Tabela 5-** Viabilidade celular relativa observada após exposição de células Jurkat às misturas La+Th e Ce+La+Th, por 24 e 48 horas.

Misturas	Concentração do Elemento (mM)			Viabilidade (%)	
	Ce	La	Th	24 h	48 h
La + Th		0,39	0,10	0,97 ± 0,04	0,99 ± 0,09
		0,78	0,20	<b>0,91 ± 0,02*</b>	0,92 ± 0,03
		1,17	0,29	0,81 ± 0,05	0,84 ± 0,07
		1,56	0,39	<b>0,74 ± 0,03*</b>	<b>0,81 ± 0,01*</b>
		1,95	0,49	0,78 ± 0,08	<b>0,76 ± 0,01*</b>
		2,34	0,59	0,67 ± 0,12	0,64 ± 0,10
Ce+La+Th	0,05	0,02	0,01	0,95 ± 0,02	1,04 ± 0,00
	0,25	0,12	0,03	0,98 ± 0,01	1,09 ± 0,01
	0,50	0,24	0,06	1,02 ± 0,01	1,00 ± 0,05

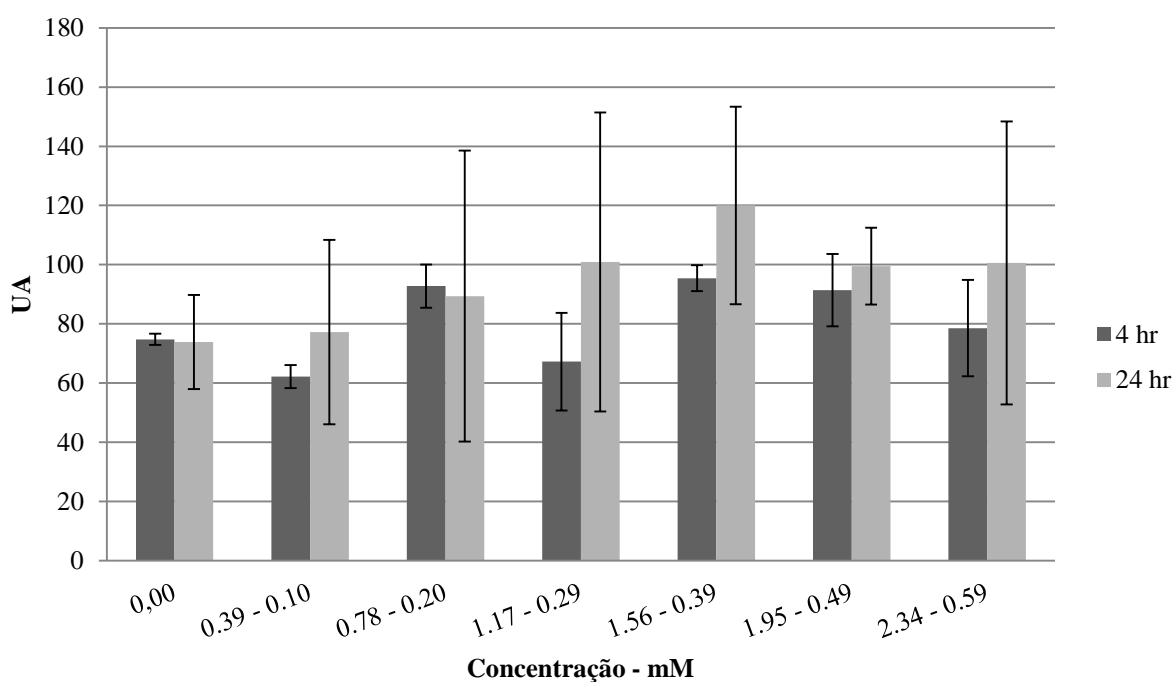
Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controle com valores-*p* de 0,05 (\*).

Quanto ao tipo de morte celular observada em culturas tratadas com La+Th observou-se uma diminuição relativa na frequência de células apoptóticas e um aumento na incidência de necrose associada a concentrações crescentes de mistura (Figura 4).



**Figura 4** - Padrão de morte das células Jurkat, resultante da exposição a misturas compostas por La+Th por 24 horas. Os valores são médias do DP de 3 experimentos.

A aplicação do ensaio cometa alcalino não revelou alterações significativas no perfil de ruptura da fita de DNA em células tratadas com Th e Ce sozinhos ou com a mistura de La e Th (Figura 5). A crescente presença de necrose e a falta de resultados positivos para o ensaio cometa sugerem que o decréscimo da proliferação celular provocado pelo uso da mistura é decorrente da citotoxicidade.



**Figura 5** – Quebras na fita de DNA de células T. Células incubadas por 4 (barras em cinza escuro) e 24 horas (barras em cinza claro) em meio contendo a mistura (La+Th). Barras de erro indicam erro padrão.

Os resultados apresentados da Tabela 6 revelam a existência de interação química entre Th e La. Observou-se a intensificação do efeito deletério do La em função da presença do Th na mistura, uma vez que o Th sozinho não apresentou alteração de resposta. A análise foi feita usando-se o método de Loewe o que gerou um índice indicativo (IL) do tipo de interação.

**Tabela 6-** Índice de Interação de Loewe (IL), relativo à proliferação, para células Jurkat expostos a duas misturas.

Concentração dos elementos (mM)						
horas	DL	Elementos individuais		La + Th mistura		IL <sup>a</sup>
		Th	La	Th <sub>mix</sub>	La <sub>mix</sub>	
24	10	0,92	3,00	0,1	0,39	0,24*
	20	0,95	4,30	0,29	1,17	0,57*
	30	0,97	4,50	0,59	2,34	0,75*
48	10	0,77	2,70	0,10	0,39	0,27*
	20	0,98	3,00	0,23	1,17	0,62*
	30	0,98	3,30	0,49	1,95	1,09

O índice de interação foi estabelecido de acordo com a seguinte relação:

<sup>a</sup> Resultados de IL = 1 efeito aditivo ou não interação; IL < 1 sinergismo ou potenciação; e IL > 1 antagonismo.

Asterisco indica valores que expressam sinergismo.

Para as doses letais DL10, DL20, com 24 e 48 horas de tratamento, e DL30, para 24 horas de exposição, o índice de Loewe foi inferior a 1. No entanto, no caso de DL30 após 48 horas de exposição o IL foi aproximadamente igual a 1, indicando que para doses letais próximas de 30% predomina o efeito aditivo, expresso pelos valores

próximos de 1. Já para doses letais menores, observa-se a intensificação do efeito letal do La em presença do Th.

Os mesmos dados foram analisados pelo programa CompuSyn cujo Índice de Combinação (IC) revelou também a existência de sinergismo para as menores doses dos elementos (Tabela 7).

**Tabela 7** - Índice de Combinação IC relativo à proliferação, obtido pelo programa CompuSyn. Células Jurkat expostos a Th e La e a combinações (La+Th)

	<b>Th</b>	<b>La</b>	<b>Proliferação</b>	<b>IC<sup>#</sup></b>
Metais				
simples	0,7		0,99	
	0,8		0,99	
	0,9		0,98	
	1,0		0,55	
		0,5	0,99	
		1,5	0,98	
		3,0	0,94	
		4,0	0,84	
		5,0	0,14	
	Metais			
em	0,1	0,39	0,97	<b>0,40</b>
combinação	0,2	0,78	0,91	<b>0,54</b>
	0,29	1,17	0,81	<b>0,61</b>
	0,39	1,56	0,74	<b>0,73</b>
	0,49	1,95	0,78	0,97
	0,59	2,34	0,67	1,00

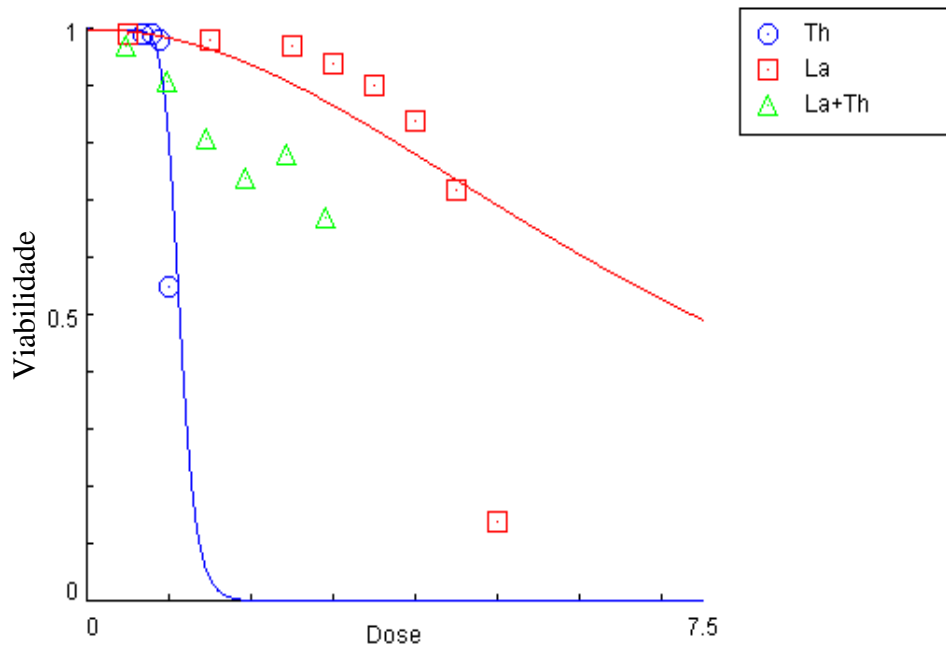
<sup>#</sup> IC<1, IC=1, e IC>1 indicam sinergismo, aditividade, e antagonismo, respectivamente.

Em negrito, valores que indicam sinergismos entre os metais da mistura.

O comportamento dos dois metais aplicados de forma isolada e em mistura está também presente nas figuras comentadas a seguir.

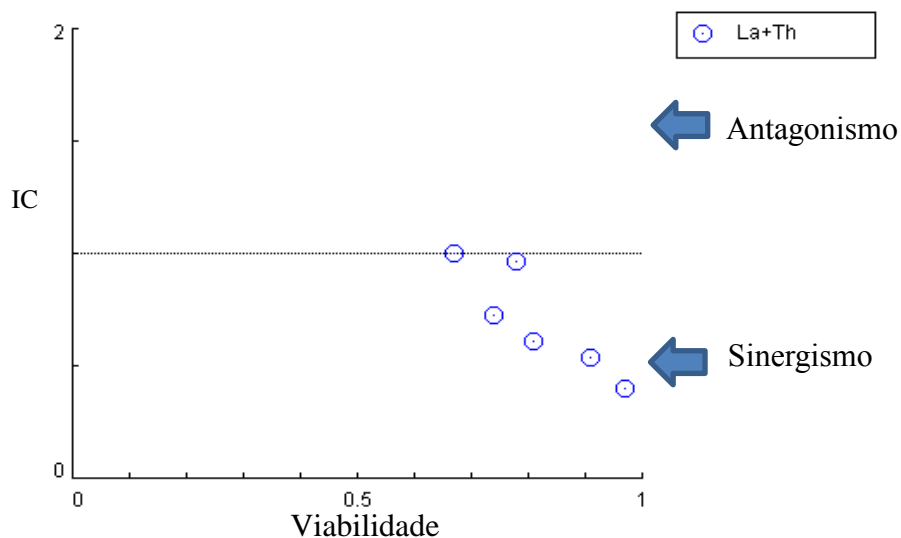


Na curva dose-efeito de viabilidade é possível observar o efeito deletério do La, a pouca ação do Th e os valores resultantes da interação entre os dois elementos representados por triângulos verdes (Figura 6).



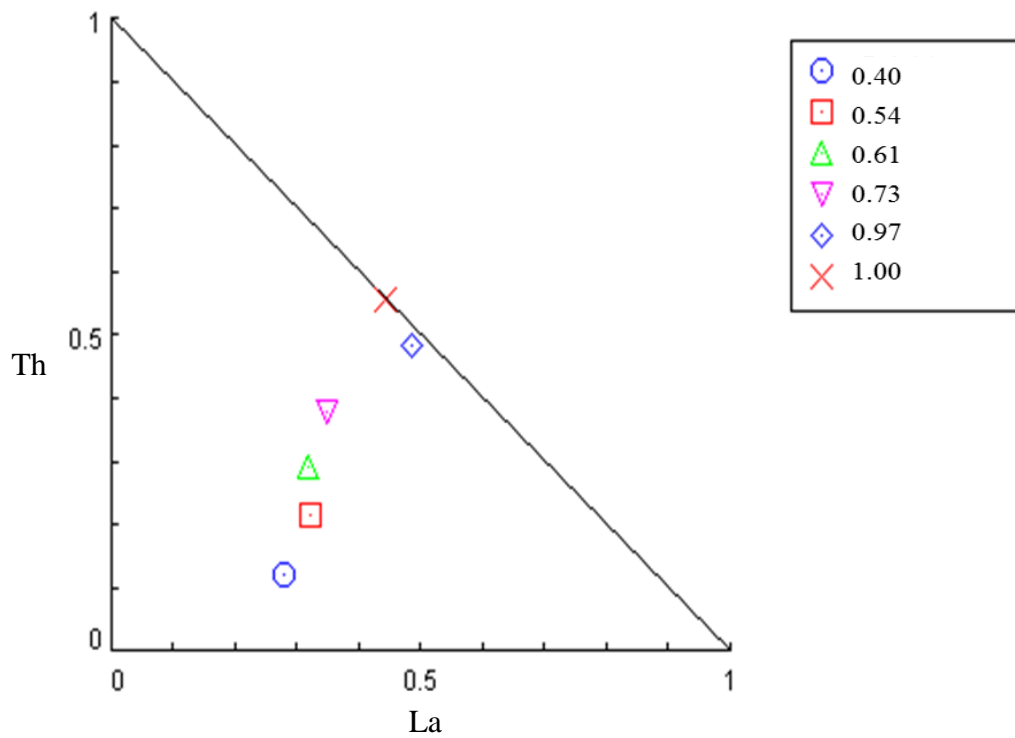
**Figura 6-** Curva dose-efeito de viabilidade de células Jurkat (CompuSyn). Exposição a Th, La e à mistura (La+Th), por 48 horas, sob a forma de metais simples e em mistura. Os valores correspondentes a cada uma das marcas ( ○, □ e △ ) representam os valores de viabilidade relativos.

O gráfico do Índice de Combinação relativo à proliferação das células Jurkat expressa o sinergismo encontrado, uma vez que os pontos em azul se encontram abaixo da linha representativa do efeito aditivo. A linha horizontal que corta o eixo Y simboliza o ponto de não interação ou de efeito aditivo. A área abaixo dessa linha corresponde ao sinergismo e a área acima da linha corresponde ao antagonismo (Figura 7).



**Figura 7-** Gráfico do índice de combinação relativo à viabilidade de células Jurkat. Células expostas à mistura (La+Th) por 24 horas, (CompuSyn). O Índice de Combinação (IC) é função da viabilidade relativa.

A representação em Isoblograma, cuja linha diagonal representa os pontos que corresponderiam às concentrações dos componentes da mistura produzindo efeito aditivo ou ausência de interação química, exhibe pontos à esquerda dessa linha refletindo também o sinergismo entre Th e La (Figura 8).



**Figura 8-** Isoblograma normalizado (CompuSyn), relativo à proliferação de células Jurkat, para combinações com razão não constante. Sinais gráficos coloridos representam valores normalizados das concentrações de La e Th cujo IC das misturas aparece no quadro à direita.

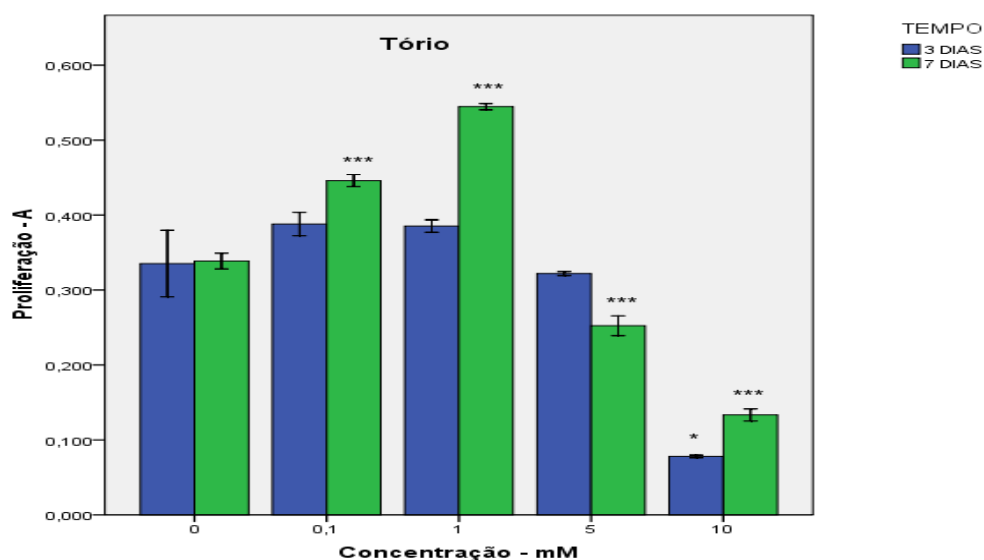
## 3.2 Osteoblastos

Células osteoblásticas foram cultivadas por até sete dias em meio de cultura contendo três metais: Th, Ce e La. A presença dos metais originou efeitos ora positivos ora negativos de acordo com as concentrações empregadas e os desfechos considerados.

### 3.2.1 Análise por Metal

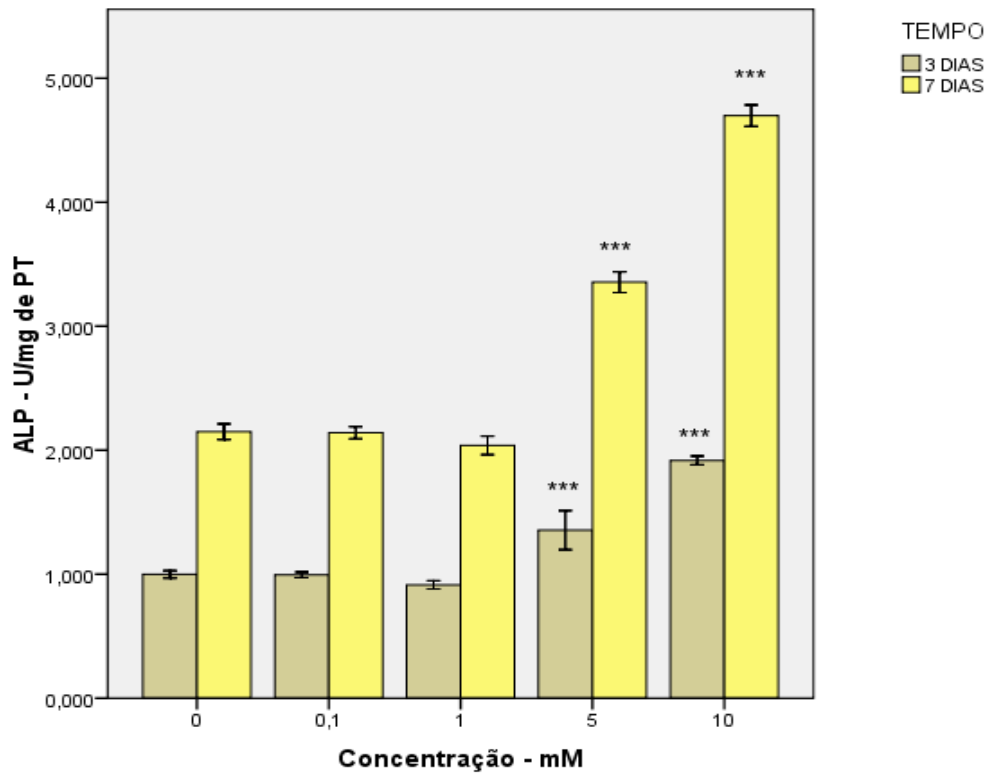
#### Tório

A análise de variância aplicada para exposição de sete dias, indicou aumento significativo no índice de proliferação no intervalo das concentrações de 0-1mM e de redução no intervalo de 1-10mM ( $p < 0,0001$ ). Para a exposição de 3 dias, apenas a concentração de 10mM apresentou valor significativamente diferente ao CTR ( $p < 0,05$ ), aplicando o teste de Games-Howell, uma vez que não havia homogeneidade de variâncias nos dados obtidos (Figura 9).



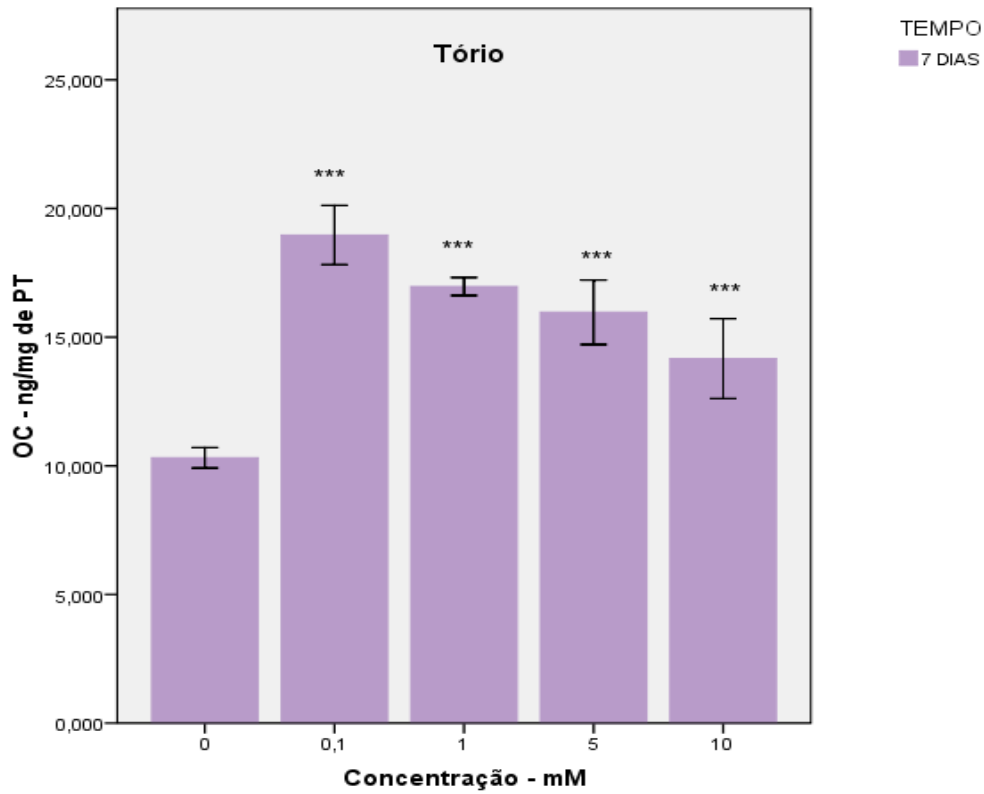
**Figura 9** - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com Th, analisada por MTT e expressa em valores de absorbância (A), medida para comprimento de onda  $\lambda = 570\text{nm}$ . Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ). 3 dias: 10mM vs 0mM (\*). 7 dias: todas as concentrações resultaram em valores significativamente diferentes entre si e vs CTR (\*\*\*).

Os valores de síntese de ALP, para os tempos de três e sete dias, foram semelhantes no intervalo das concentrações de 0-1mM. As concentrações de 5-10mM geraram um aumento expressivo na síntese da enzima ( $p < 0,0001$ ), indicando uma possível estimulação na diferenciação dos osteoblastos (Figura 10).



**Figura 10** - ALP sintetizada por células MG63 expostas a Th. Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ). 3 dias: 5 e 10mM vs 0 a 1mM (\*\*\*) e 10mM vs 5mM (\*\*). 7 dias: 5 e 10mM vs 0 a 5mM (\*\*\*) e 5mM vs 0 a 1mM (\*\*\*)).

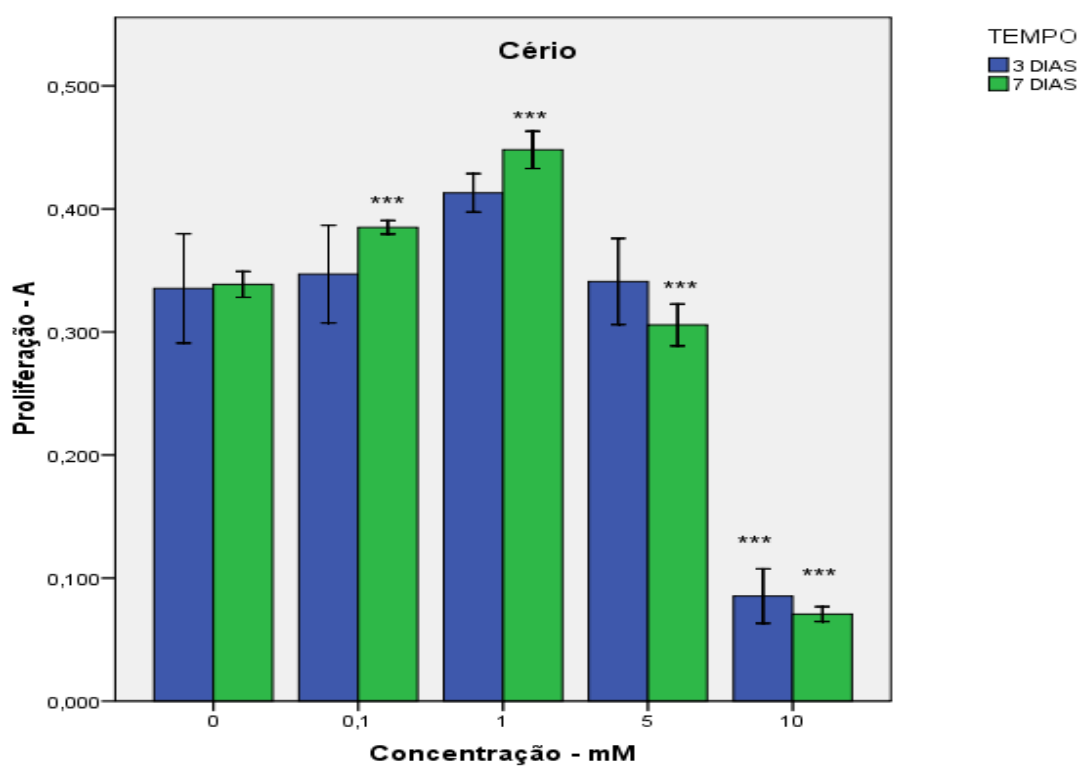
Os valores encontrados para a síntese de OC foram significativamente superiores ao grupo CTR ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações restantes (Figura 11).



**Figura 11** - OC sintetizada por células MG63 expostas a Th, por 7 dias. Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\*\*) =  $p < 0,001$ . Todas as concentrações vs CTR (\*\*\*)).

## Cério

Para as amostras de osteoblastos expostas a Ce por três dias, apenas a concentração equivalente a 10mM apresentou alteração significativa na proliferação. Osteoblastos expostos a Ce apresentaram aumento no índice proliferação no intervalo das concentrações de 0-1mM, significativo para o tratamento de sete dias ( $p < 0,0001$ ); a concentração de 5mM apresentou valores semelhantes ao do controle; no intervalo de 1-10mM observou-se uma redução significativa da proliferação celular para  $p < 0,0001$  (Figura 12).



**Figura 12** - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com Ce, analisada por MTT e expressa em valores de absorbância (A), medida para comprimento de onda  $\lambda=570\text{nm}$ . Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\*\*) =  $p < 0,0001$ . 3 dias: 10mM vs 0 a 5mM (\*\*\*). 7 dias: CTR vs todas as concentrações (\*\*\*)).

Considerando-se os tempos de exposição ao Ce de 3 e 7 dias, a análise de variância indicou haver relativa homogeneidade quanto à produção de enzima para as concentrações de 0-1mM. A síntese ALP apresentou redução significativa ( $p < 0,005$ ) relativamente às células tratadas com 0 e 1mM, e a partir do intervalo de concentração de 1-10mM houve crescimento significativo na síntese da enzima para  $p < 0,0001$ , sugerindo um incremento na diferenciação dos osteoblastos (Figura 13).

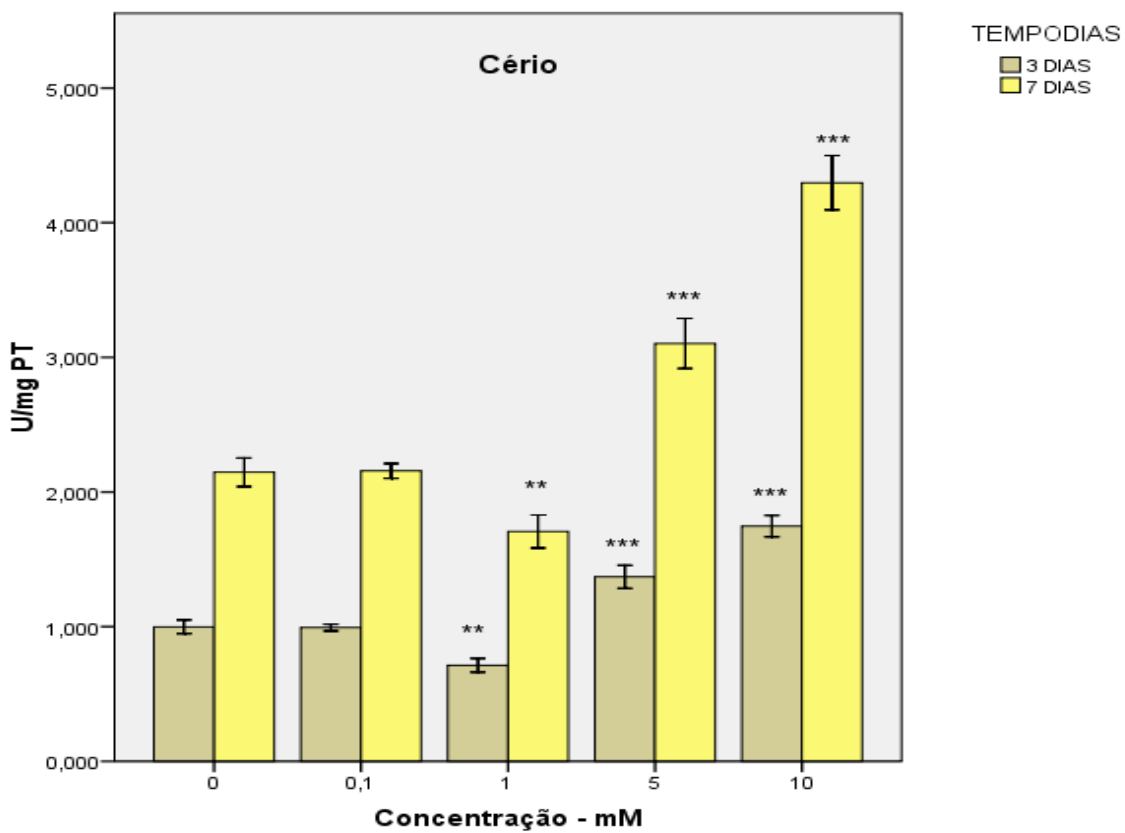
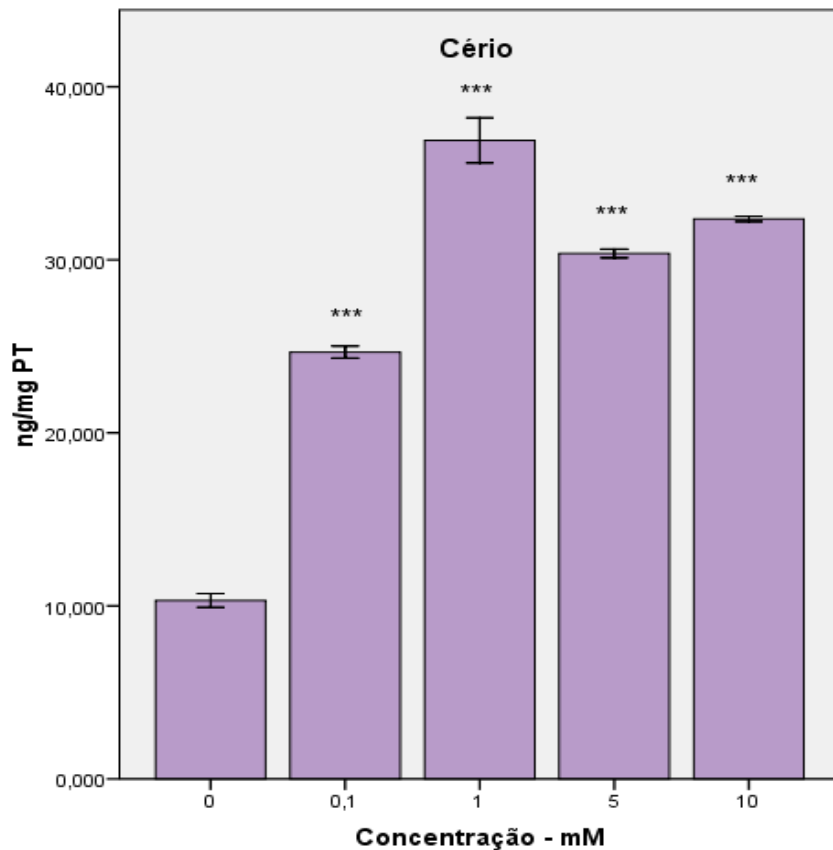


Figura 13 – ALP sintetizada por células MG63 expostas a Ce. Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ). 3 e 7 dias: 10mM vs 0 a 5mM (\*\*\*); 5mM vs 0 a 1mM (\*\*\*); 1 vs 0 e 0,1mM(\*\*).



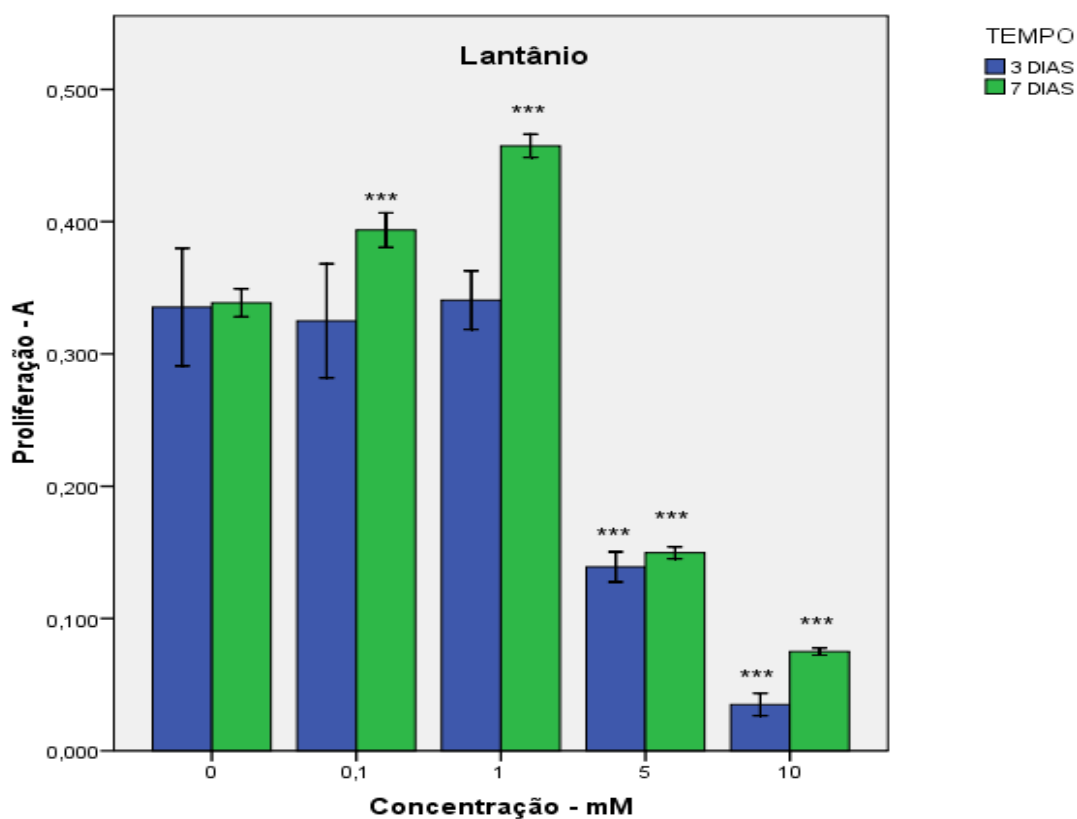
A síntese de OC de células expostas a Ce por 7 dias indica que a concentração de 5mM do metal gerou uma redução significativa na síntese da enzima com relação aos resultados de 1 e 10mM ( $p < 0,001$ ). No entanto, observou-se um crescimento significativo na síntese de OC no intervalo das concentrações de 0,1-10mM ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo CTR (Figura 14).



**Figura 14** - OC sintetizada por células MG63 expostas a Ce. Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\*\*) =  $p < 0,0001$ . 7 dias: 0,1 a 10mM vs CTR (\*\*\*) ; 5mM vs 0 a 1 e 10mM (\*\*\*) .

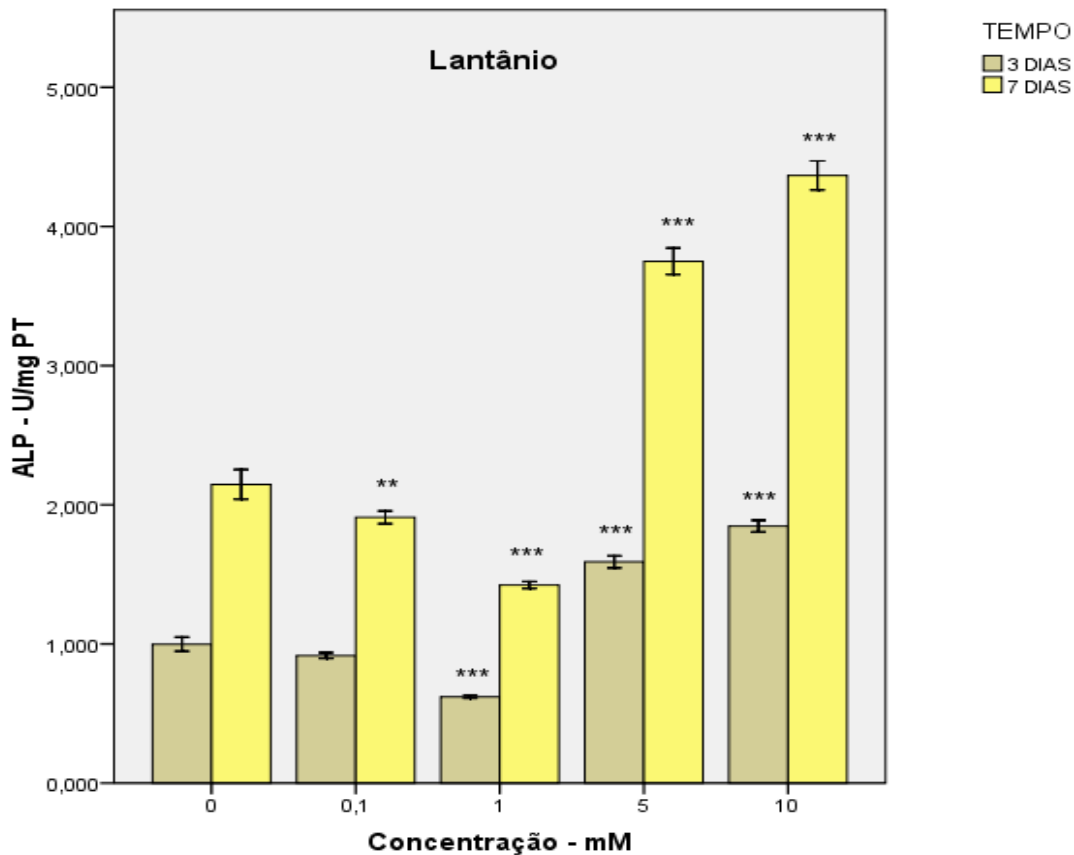
## Lantânio

Com relação à exposição das células MG63 ao La por 3 dias, a proliferação se manteve sem alterações significativas ( $p > 0,05$ ) para as concentrações do intervalo 0-1mM e observou-se uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) da proliferação no intervalo de 5-10mM. Já para 7 dias de tratamento, nota-se um crescimento significativo ( $p < 0,001$ ) do indicador para as concentrações do intervalo de 0,1-1mM e uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) para o intervalo de 5-10mM (Figura 15). O grupo de osteoblastos tratados por 3 dias não exibiu homogeneidade de variâncias. Nesse caso o teste *post hoc* aplicado após ANOVA foi (Games-Howell).



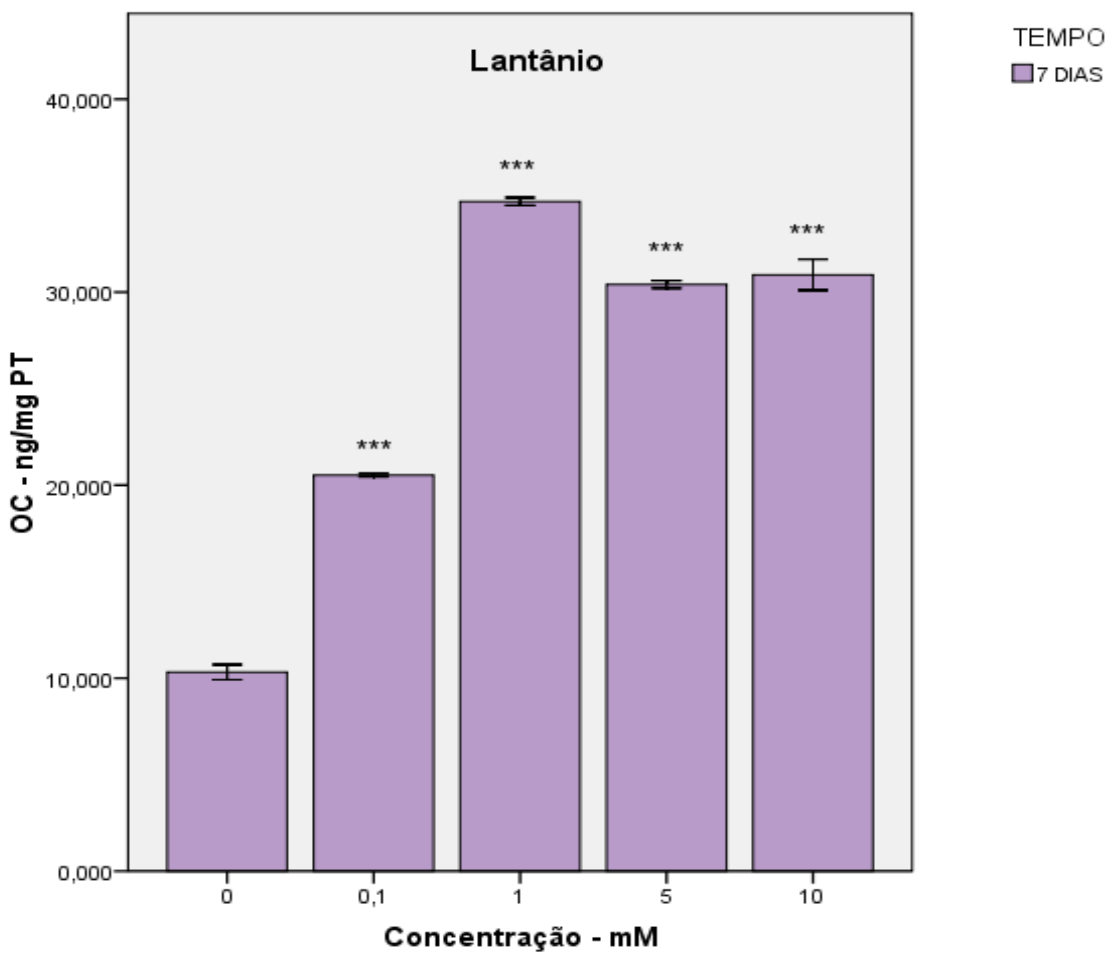
**Figura 15** - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com La, analisada por MTT e expressa em valores de absorbância (A), medida para comprimento de onda  $\lambda = 570\text{nm}$ . Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\*\*) =  $p < 0,0001$ . 3 dias: 5 e 10mM vs CTR (\*\*\*) . 7 dias: todas as concentrações diferem entre si (\*\*\*) .

Com relação ao desfecho síntese de ALP, após 3 dias de exposição, a concentração 1mM de La apresentou uma diminuição significativa de valor para a síntese da enzima ( $p < 0,0001$ ). Porém, os resultados obtidos para as concentrações do intervalo de 5-10mM são significativamente superiores ao CTR. Para o tratamento de 7 dias observou-se uma redução na síntese de ALP seguido de um incremento da mesma para as concentrações de 5-10mM com  $p < 0,0001$  (Figura 16).



**Figura 16** - ALP sintetizada por células MG63 expostas a La. Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ). 3 dias, 1 a 10mM vs CTR (\*\*\*). 7 dias, todas as concentrações diferem entre si e vs CTR (\*\* e \*\*\*).

A exposição dos osteoblastos a La por 7 dias resultou na ativação da síntese de OC. Observou-se aumento na síntese da enzima para todas as concentrações de La empregadas ( $p < 0,0001$ ). No entanto a síntese de OC, correspondente às concentrações de 5 e 10mM, mostrou-se significativamente menor do que o valor encontrado para 1mM de La para  $p < 0,0001$  (Figura 17).



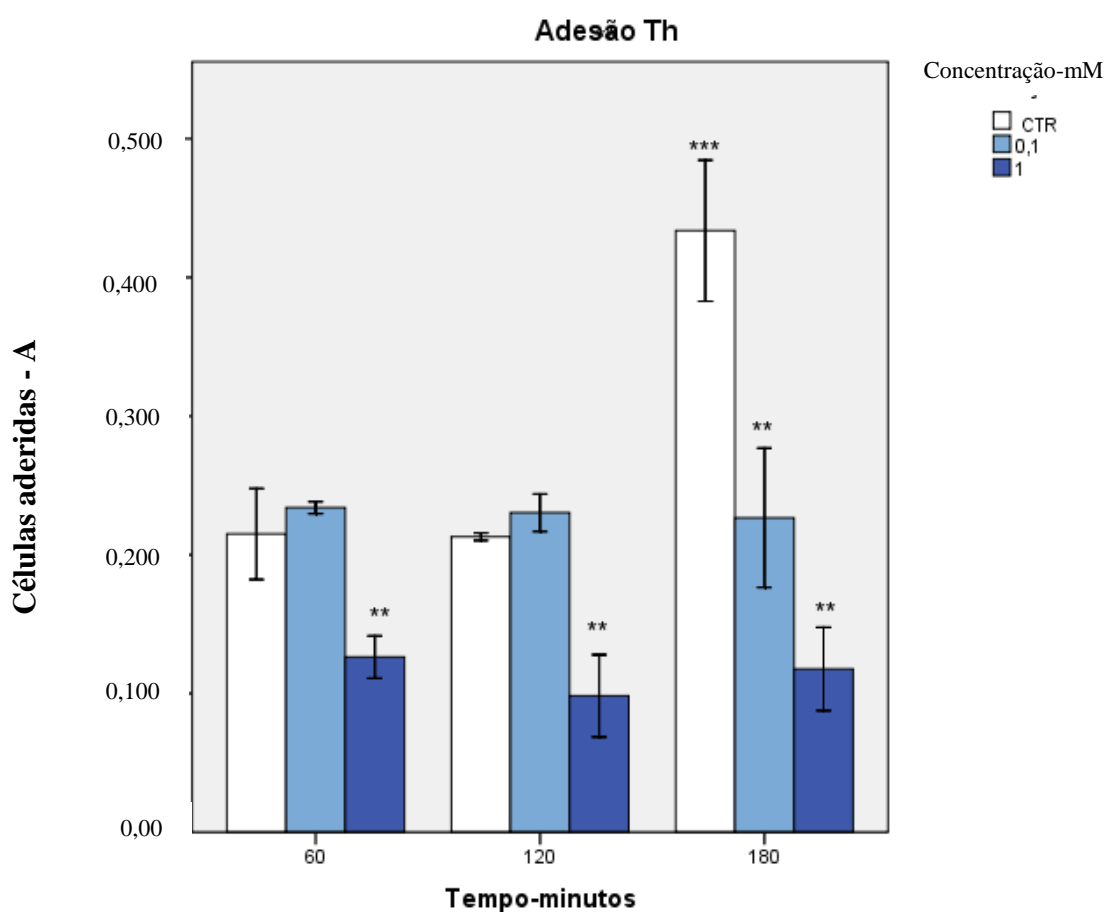
**Figura 17** - OC sintetizada por células MG63 expostas a La. Os pontos representam médias e DP de 3 experimentos. (\*\*\*)  $p < 0,0001$ . 7 dias: 5-10mM vs 0-1mM (\*\*\*) ; CTR a 1mM vs todas as concentrações (\*\*\*) .

### **3.2.2 Análise por Desfecho**

#### ***Adesão celular***

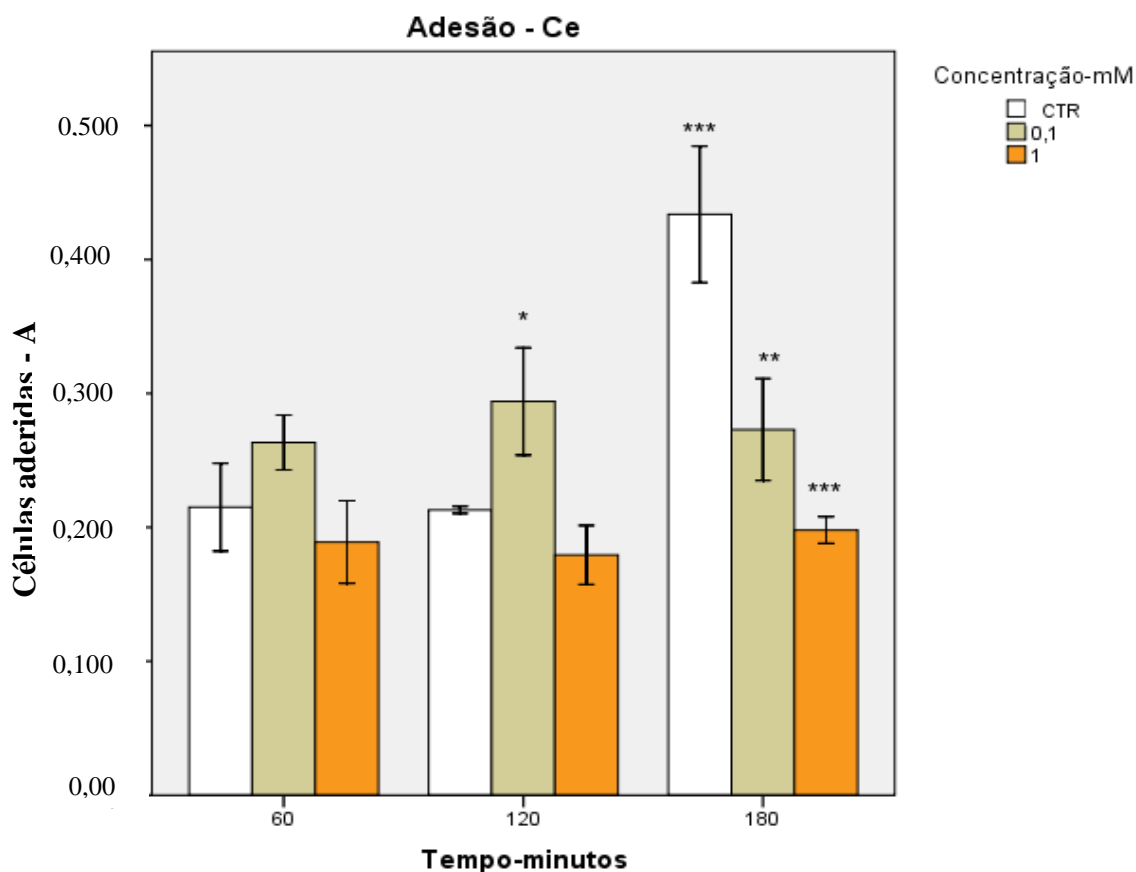
Os próximos gráficos apresentados avaliam a adesão dos osteoblastos à superfície das placas de cultura previamente recobertas com meio de cultura contendo cada um dos três metais nas concentrações 0,1 e 1,0mM. A avaliação da quantidade de células aderidas no fundo das placas foi obtida por espectrofotometria após a redução do MTT a formazan.

**Tório** – os dados apresentaram uma distribuição assimétrica e por este motivo os valores foram transformados pelo equivalente ao valor da raiz quadrada (SQRT). Os novos valores apresentaram uma distribuição normal à qual foi aplicada a análise de variância. Para os três intervalos de tempo de leitura e concentração de 1mM de Th, a quantidade de células aderidas foi significativamente menor que o grupo controle. Após 3 hr de incubação a adesão das células do grupo controle mostrou forte incremento relativamente aos tempos anteriores (Figura 18).



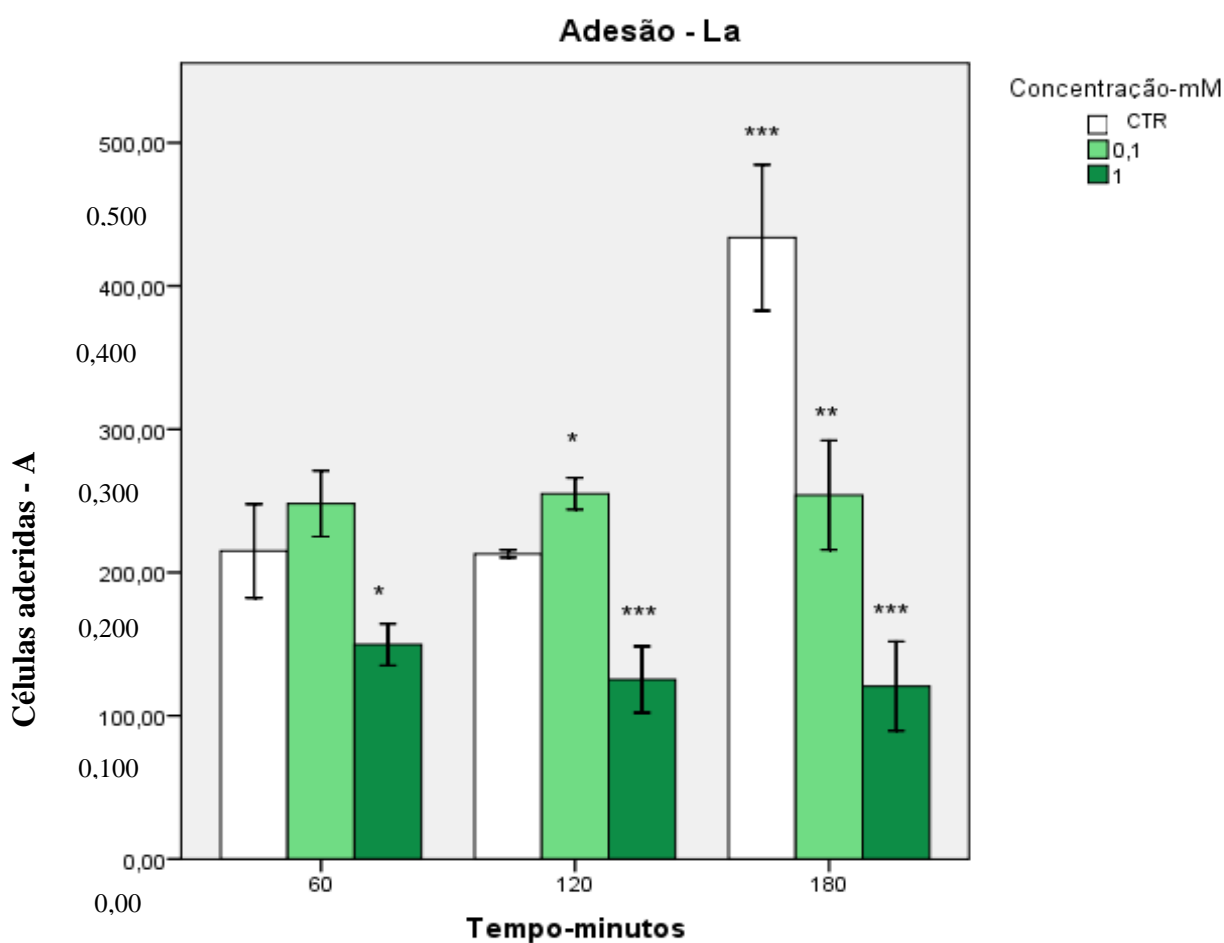
**Figura 18** – Adesão de células MG63, após incubação com as concentrações de Th de 0,1 (azul claro) e 1mM (azul escuro). Os tempos de exposição foram de 60, 120 e 180 minutos. Utilizada a redução do sal de tetrazolium, MTT, como indicador. Cada ponto representa a média  $\pm$  SD de três experimentos (\*\* =  $p < 0.001$ ).

**Cério** – a diferença mais significativa com relação à quantidade de células aderidas ao substrato, foi observada após 180 minutos do plaqueamento, com a menor adesão ao substrato observada na placa contendo meio com a concentração de 1mM de Ce, relativamente ao CTR do mesmo tempo. No tempo de 120 minutos observou-se uma maior adesão das células para a concentração equivalente a 0,1mM de Ce. Este resultado veio a confirmar a observação feita quando eram realizados os ensaios piloto. Mas, a partir de 3 hr de incubação a adesão das células do grupo CTR passa a ser superior, com  $p < 0,0001$  (Figura 19).



**Figura 19** - Adesão de células MG63, após incubação com as concentrações de Ce de 0,1(caramelo) e 1mM (laranja). Os tempos de exposição foram de 60, 120 e 180 minutos. Utilizada a redução do sal de tetrazolium, MTT, como indicador. Cada ponto representa a média  $\pm$  SD de três experimentos (\*\*=  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*=  $p < 0,0001$ ).

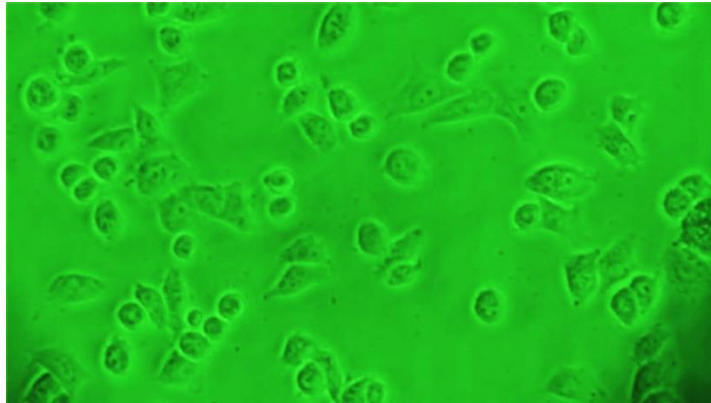
**Lantânio** - para os três intervalos de tempo de leitura houve diferenças significativas com relação ao grupo controle na concentração de 1mM. A concentração de 0,1mM apresentou diferença significativa nos intervalos 120 e 180 minutos, sendo que a adesão foi maior do que a do grupo controle no tempo de 2 hr, tal como no experimento realizado com Ce (Figura 20).



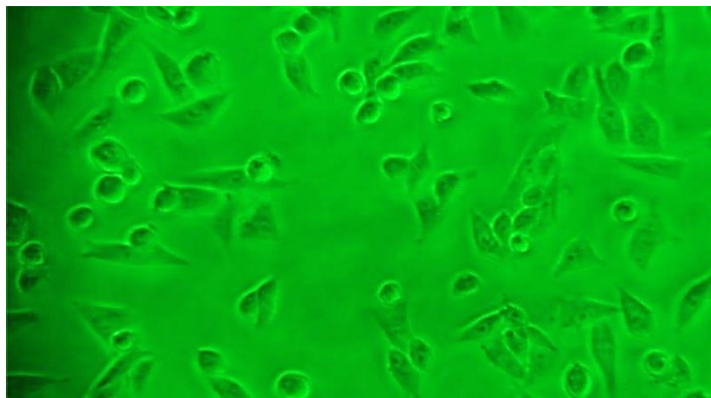
**Figura 20** - Adesão de células MG63, após incubação com as concentrações de La de 0,1(verde claro) e 1mM (verde escuro). Os tempos de exposição foram de 60, 120 e 180 minutos. Utilizada a redução do sal de tetrazolium, MTT, como indicador. Cada ponto representa a média  $\pm$  SD de três experimentos (\*\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\* =  $p < 0.0001$ ).



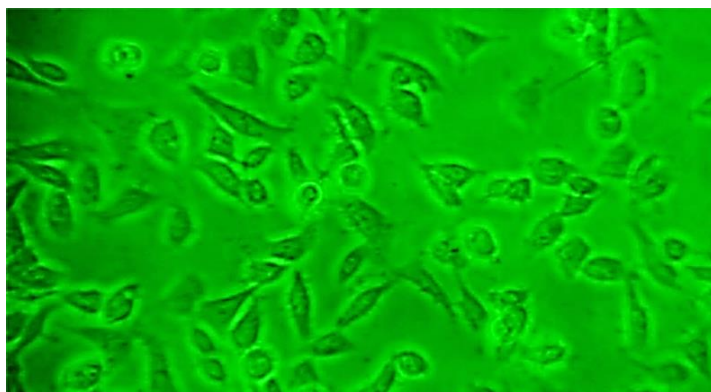
As células em processo de adesão ao substrato do fundo da placa puderam ser visualizadas e fotografadas em microscópio invertido, com aumento de 100x. Em 60 minutos a presença de células ovaladas é predominante e com o decorrer do tempo vai-se observando o crescimento no número de células em processo de adesão através das alterações morfológicas (Figura 21).



**60 minutos**



**120 minutos**



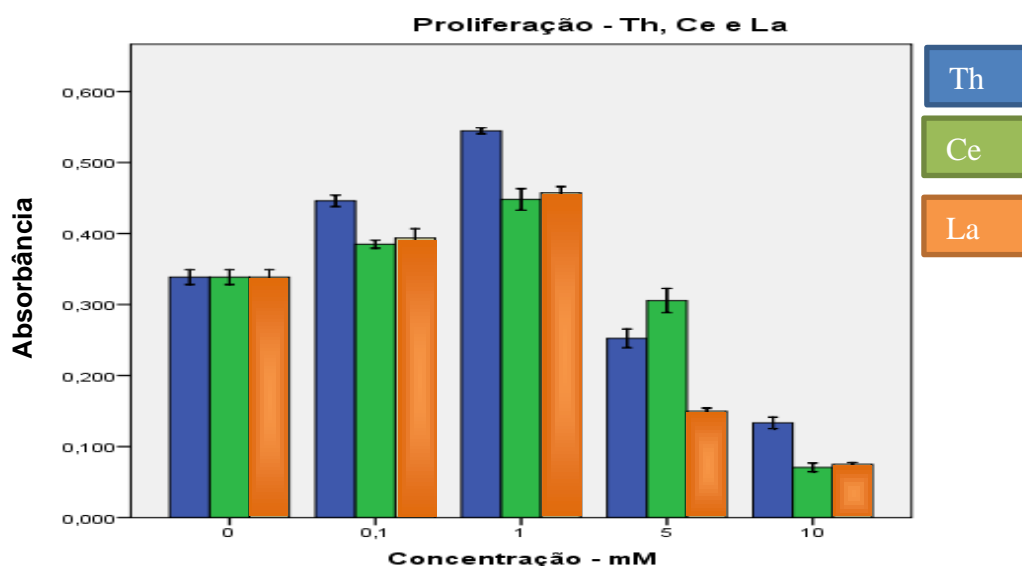
**180 minutos**

**Figura 21** - Imagens ilustrando a evolução no processo de adesão de células MG63 (osteoblastos) à superfície da placa. Três intervalos de tempo de leitura. Células em meio de cultura sem tratamento.

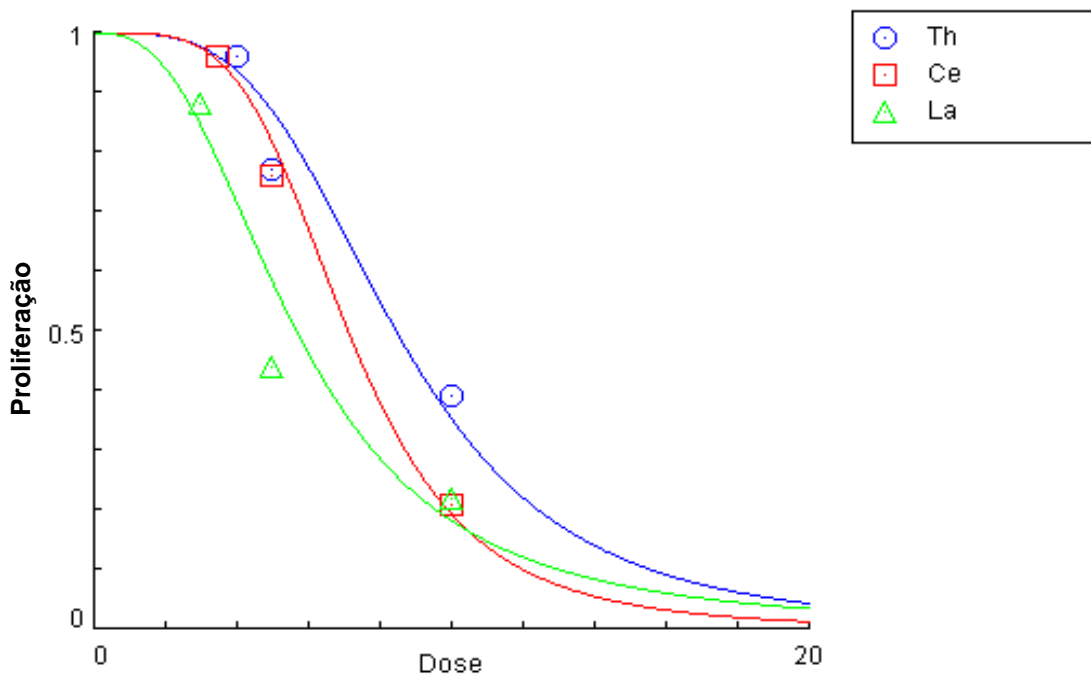
## *Proliferação*

Embora os dois tempos de exposição testados apresentem padrões gráficos semelhantes tanto para proliferação como para a síntese de fosfatase alcalina o efeito biológico foi mais expressivo na exposição de maior tempo. Os gráficos apresentados nesta seção expressam apenas os resultados obtidos após sete dias de exposição. As diferenças significativas mencionadas nos gráficos a seguir são baseadas na informação já apresentada no capítulo 3.2.1.

Os três metais estimularam a proliferação dos osteoblastos no intervalo das concentrações de 0,1-1mM e de restringiram a mesma no intervalo de 5-10mM (Figura 22 e 23).



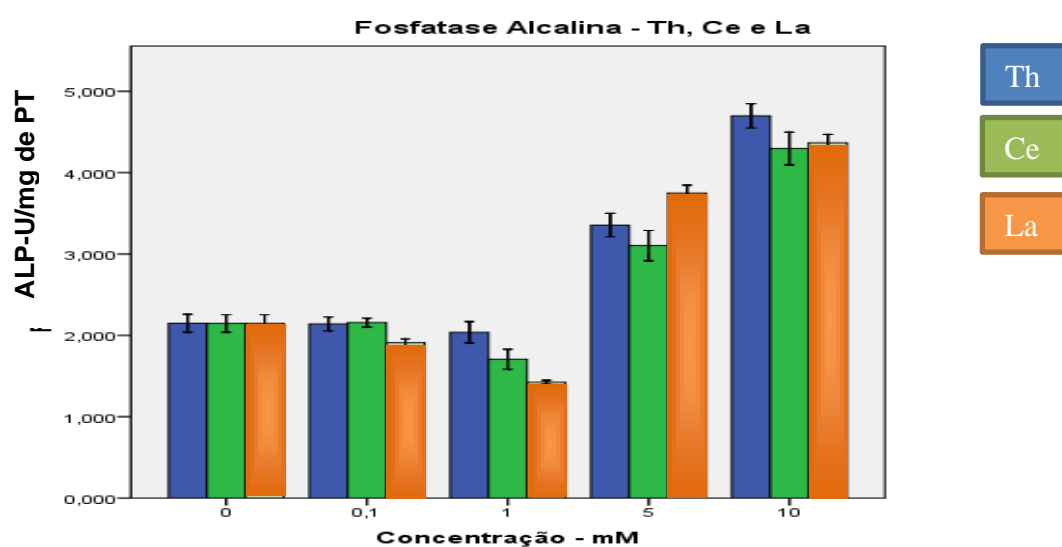
**Figura 22** - Proliferação de células MG63, em resposta à incubação com Th, Ce e La – gráfico comparativo para os três metais. Células incubadas por 7 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  SD de três experimentos.



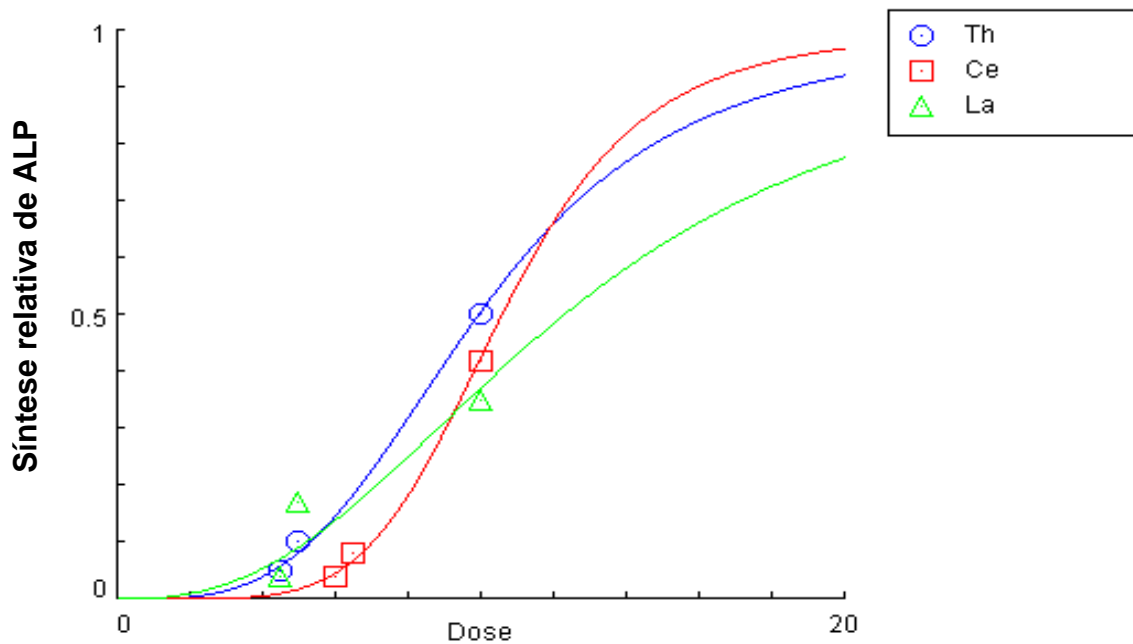
**Figura 23** - Proliferação celular resultante da exposição dos osteoblastos a Th, Ce e La. Exposição aos metais, na forma simples, por 7 dias, considerando as doses do intervalo de 5 a 10mM (CompuSyn). Os valores correspondentes a cada uma das marcas (○, □, △) representam os valores percentuais de proliferação relativos ao grupo controle.

## *Fosfatase Alcalina*

Os resultados apresentados nas Figuras 24 e 25 indicam que Th, Ce e La indicam uma interferência dos metais sobre a diferenciação celular inicial dos osteoblastos. Para os três metais a síntese de fosfatase alcalina mostrou-se significativamente aumentada nos grupos correspondentes ao intervalo das concentrações de 5-10mM quando comparados ao grupo controle. Porém, antes deste aumento na síntese da enzima observou-se, para a concentração de 1mM do Ce e do La, uma redução significativa na síntese da ALP (Figura 24). A concentração de 1mM de Th não apresentou diferença no desfecho com relação ao grupo controle (0mM).



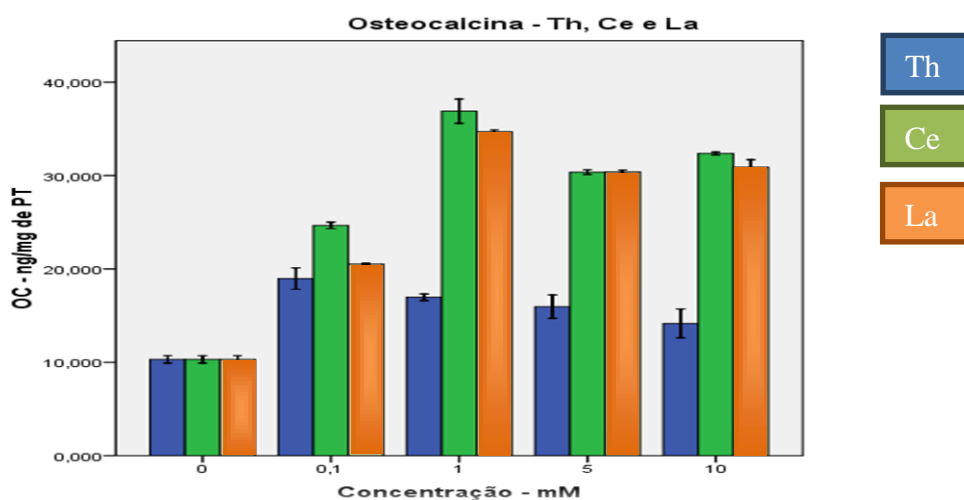
**Figura 24** - Síntese comparativa da enzima ALP por células MG63, em resposta à incubação com Th, Ce e La – gráfico comparativo para os três metais. Células incubadas por 7 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  SD de três experimentos.



**Figura 25** - Síntese da enzima ALP após exposição da linhagem MG63 a Th, Ce e La. Exposição aos metais na forma simples, por 7 dias, considerando as doses do intervalo de 5 a 10mM (CompuSyn). Os valores correspondentes a cada uma das marcas (○, □ e △) representam os valores percentuais de proliferação relativos ao grupo controle.

## Osteocalcina

A síntese de osteocalcina, como expressão da maturação dos osteoblastos no sentido da diferenciação destes em osteócitos, apresentou aumento significativo em resposta à exposição aos três metais. O padrão de resposta foi mais semelhante para os lantanídeos - Ce e La (7 dias,  $p < 0,01$ ), (Figura 26). A síntese de osteocalcina após tratamento com Th tem uma elevação menos acentuada do que com os lantanídeos, mas é significativamente superior ao controle para todas as concentrações do metal ( $p < 0,01$ ).



**Figura 26-** Síntese comparativa da síntese de OC por células MG63, em resposta à incubação com Th, Ce e La – gráfico comparativo para os três metais. Células incubadas por 7 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  SD de três experimentos.

### 3.2.3 Interações entre os Metais

Para as análises realizadas sobre interações químicas entre os metais foi necessário trabalhar com apenas uma das vertentes expressas nas curvas dose-resposta, pois ativação e inibição devem ser analisadas separadamente <sup>74</sup>. Nesse caso foi escolhida a vertente correspondente à inibição da proliferação compreendida no intervalo das concentrações 1-10mM. As Figuras 23 e 25 mostram gráficos gerados pelo programa computacional CompySyn.

Novos parâmetros foram gerados pelo programa: m- correspondendo à forma da curva; Dm- representando a potência do agente químico ou concentração capaz de produzir 50% de efeito; e r- a qualidade do ajuste.

Os resultados obtidos para proliferação e a síntese de fosfatase alcalina foram transformados em percentual relativo ao grupo controle, menos 1. Dessa forma os valores ficaram compreendidos na faixa maior de -1 a 1 e puderam ser analisados utilizando-se o programa CompuSyn.

A Tabela 8, criada a partir do programa CompuSyn, exhibe na metade superior os valores relativos de Proliferação para doses simples de 5 e 10mM dos três metais aplicados em culturas de osteoblastos. Na parte inferior da Tabela estão os valores relativos da Proliferação celular para as misturas contendo 5+5mM de cada elemento, uma vez que esta foi a combinação cujos dois valores faziam parte da mesma vertente nas respectivas curvas de proliferação (Fig. 9). A última coluna da direita mostra os valores do Índice de Combinação (IC). Estes valores indicam a mistura Ce+La exibe um valor de IC que é considerado como efeito aditivo. As misturas dos metais Th+Ce e Th+La mostraram um leve sinergismo uma vez são valores inferiores a 1<sup>59</sup>. Neste caso as duas misturas não confirmam a hipótese de não interação proposta no início do projeto.

A Tabela 9, obtida da mesma forma que a tabela anterior, mostra em sua quinta coluna os valores relativos ao controle negativo de síntese da enzima ALP. A sexta coluna correspondente aos valores de IC mostra que para esse desfecho a mistura Th+La, na faixa dos valores aditivos, confirma a hipótese de não interação valor de IC.

Foi observado um leve antagonismo entre os metais das mistura: Th+Ce e Ce+La, o que anula a hipótese de não interação entre os metais.

**Tabela 8-** Proliferação relativa dos osteoblastos: relação dose-efeito de Th, Ce e La e respectivas combinações após 7 dias de tratamento (CompuSyn).

	Th	Ce	La	Proliferação	IC <sup>#</sup>
<hr/>					
Metais					
Simples (mM)	5,00			0,77	
	10,00			0,39	
		5,00		0,76	
		10,00		0,21	
			5,00	0,44	
			10,00	0,22	
<hr/>					
Metais em combinação (mM)					
Th+Ce	5,00	5,00		0,58	<b>0,80</b>
Th+La	5,00		5,00	0,56	<b>0,78</b>
Ce+La	5,00		5,00	0,57	0,98
<hr/>					

<sup>#</sup> IC<1, IC=1, e IC>1 indicam sinergismo, aditividade, e antagonismo, respectivamente. Em negrito estão os valores que expressam interação química (sinergismo).



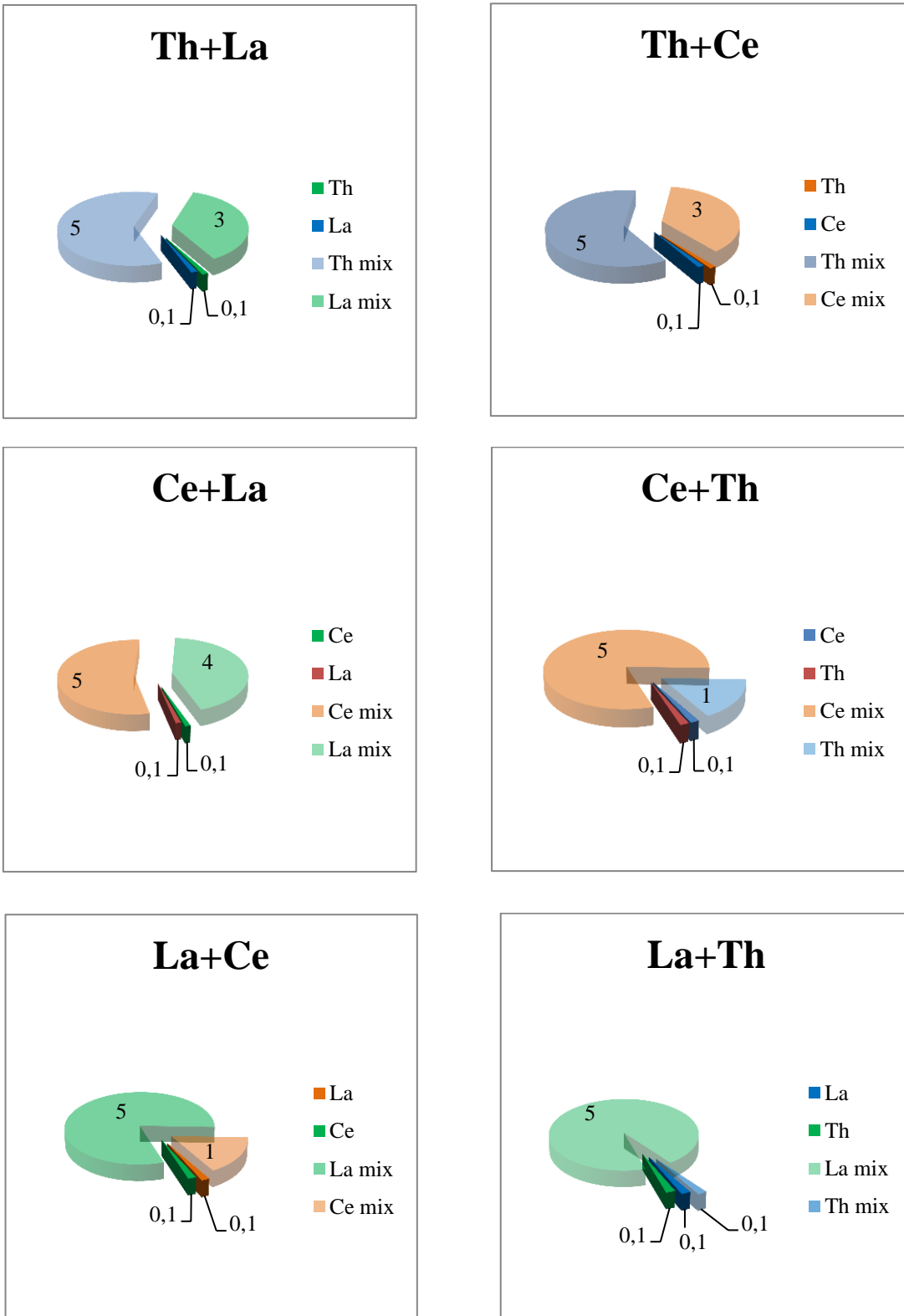
**Tabela 9**-Síntese relativa da enzima ALP por células MG63: relação dose-efeito para Th, Ce e La e respectivas combinações, após 7 dias de tratamento (CompuSyn).

	<b>Th</b>	<b>Ce</b>	<b>La</b>	<b>F. Alcalina</b>	
<hr/>					
Metais					
simples	5,00			0,10	
(mM)	10,00			0,50	
		5,00		0,04	
		10,00		0,42	
			5,00	0,17	
			10,00	0,35	
					<b>IC<sup>#</sup></b>
<hr/>					
Metais					
em combinação					
(mM)					
Th+Ce	5,00	5,00		0,36	<b>1,12</b>
Th+La	5,00		5,00	0,36	1,10
Ce+La	5,00		5,00	0,29	<b>1,14</b>
<hr/>					

<sup>#</sup> IC<1, IC=1, e IC>1 indicam sinergismo, aditividade, e antagonismo, respectivamente. Em negrito estão os valores que expressam interação química (antagonismo)

### *Osteocalcina*

No caso da síntese da osteocalcina os valores encontrados pós-tratamento foram equivalentes a múltiplos dos valores encontrados no grupo controle. Por esta razão não foi possível utilizar o programa CumpuSyn, uma vez que ele trabalha com a faixa de valores de 0 a 1. Desta forma, a análise de interação entre os elementos foi avaliada considerando-se o modelo de aditividade de Loewe e visualizada através de representação gráfica (Figura 27) e da Tabela 10.



**Figura 27** – Representação gráfica da síntese de OC pelas células MG63. Concentrações de Th, Ce e La (mM) em forma simples e as respectivas concentrações quando integradas às misturas, que resultaram na síntese em dobro da proteína.

**Tabela 10-** Síntese de OC em osteoblastos: concentrações de Th, Ce e La e respectivas combinações que dobram a síntese da proteína (Índice de Loewe).

Misturas	Concentrações metais simples (mM)			IL
	Th	Ce	La	
	0,1	0,1	0,1	
Th+La	5,0		3,0	80
Th+Ce	5,0	3,0		80
Ce+Th	5,0	4,0		90
Ce+La		5,0	1,0	60
La+Th	5,0		0,1	51
La+Ce		5,0	1,0	60

O Índice de Loewe calculado de acordo com a seguinte formulação:

$$[A]_{\text{mix}} / [A] + [B]_{\text{mix}} / [B].$$

IL = 1 indica não interação; IL < 1 indica sinergismo; e IL > 1 indica antagonismo.

## 4 Discussão

A primeira parte deste estudo, dedicada à determinação dos efeitos do Th, Ce e La usados de forma isolada, não só ajudou à obtenção de informação a respeito dos efeitos tóxicos destes três elementos sobre linhagens de células Jurkat e MG63, modelos de linfócitos T e osteoblastos humanos, mas também ofereceu os subsídios necessários para estabelecer o delineamento experimental utilizado para o estudo de misturas binárias.

A dose absorvida de Th, resultante do decaimento radioativo durante os experimentos, representa um valor baixo com relação aos efeitos determinísticos que poderiam ocorrer nos intervalos de tempo empregados. A maior concentração do metal utilizada nos ensaios foi 434 $\mu$ g/mL, o que corresponde a uma taxa de dose de 31,6mGy/ano<sup>77</sup>. O limiar de dose absorvida para efeitos determinísticos em células da medula óssea, por exemplo, é de 500mGy<sup>78</sup>. Considerando que o maior tempo de exposição das células Jurkat ao Th foi de 48 horas e das células MG63 ao Th foi de 7 dias, a dose absorvida pelos dois modelos celulares foi de aproximadamente 0,2 e 0,6mGy, respectivamente.

### 4.1 Células Jurkat

Os resultados obtidos com células Jurkat demonstram que Th e Ce apresentados de forma isolada às células não causaram efeitos tóxicos, nas condições experimentais aplicadas, e em acordo com os resultados reportados por Hirano e Suzuki<sup>79</sup>. Por sua vez o La provocou uma redução na proliferação celular a partir da concentração de 3mM<sup>60</sup>, resultado este semelhante ao encontrado em outras pesquisas<sup>80-83</sup>.

A exposição concomitante de células Jurkat a Th, La e Ce, na mesma proporção à da monazita, não afetou a proliferação celular. Isso se deve provavelmente ao fato de as concentrações de La e Th serem bem inferiores às respectivas concentrações citotóxicas. No entanto, os resultados do tratamento com a mistura de La e Th indicam que existe uma intensificação do efeito do La em presença de Th, que resulta em uma

redução significativa na proliferação dos linfoblastos. Interessante notar que os valores do índice do Loewe mostram um sinergismo mais intenso para as concentrações dos metais mais baixas da mistura Th+La, semelhante aos resultados obtidos no estudo com baixas concentrações de dois PBDEs, (difênil éteres polibromados), retardantes de chamas, em células de neuroblastoma humano<sup>53,57</sup>. Este resultado sugere haver uma relação inversa entre a concentração de metais da mistura e a intensidade do sinergismo. A relação entre as concentrações de metais e sinergismo é observada em ambos os tempos de exposição: 24 e 48 horas (Tabelas 6 e 7). Este resultado é bastante relevante para a avaliação de risco ocupacional, pois doses baixas são mais relevantes em termos de exposição ocupacional às quais os trabalhadores estão normalmente submetidos.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são provavelmente produzidas em células tratadas com La<sup>60,84</sup> e, por vezes também com Th, como observado em ratos<sup>85</sup>. Existem referências na literatura mostrando que espécies químicas de Ce têm potencial de restringir a produção de ROS<sup>86-88</sup>. Esta característica pode ter reduzido ou eliminado os efeitos de Th e La na mistura La+Ce+Th, além do fato de as concentrações de Th e La se encontrarem em uma faixa inferior àquela capaz de produzir citotoxicidade.

A proliferação celular reduzida, observada em função do sinergismo entre Th e La, provavelmente não envolve alterações na molécula de DNA, uma vez que houve predomínio de morte celular por necrose e o ensaio cometa não exibiu diferenças significativas entre os tratamentos com as diferentes concentrações. Portanto, o sinergismo pode ter sido consequência de alterações nos compostos químicos ou nos receptores celulares<sup>47,89</sup>.

## **4.2 Células MG63**

Na primeira parte do capítulo *Resultados* aplicado aos osteoblastos, os dados foram apresentados levando-se em conta o efeito de cada um dos metais. E na segunda parte os dados foram reinterpretados sob a ótica dos desfechos. Essa forma de avaliação permitiu uma visão mais abrangente do assunto, uma vez que foram trabalhados três metais e três desfechos. A terceira parte tratou da questão interações químicas.

Para a discussão dos resultados foram considerados os experimentos de sete dias por apresentarem tendências semelhantes aos experimentos de três dias e as diferenças de resposta serem mais significativas.

#### **4.2.1 Tório**

A exposição de células osteoblásticas ao Th originou uma curva dose-resposta em forma de sino mostrando que concentrações iguais ou inferiores a 1mM produziram um estímulo significativo à proliferação celular e as concentrações de 5-10mM exibiram efeito negativo sobre a proliferação. Estes resultados diferem daqueles obtidos com macrófagos <sup>90</sup> e células Jurkat (neste trabalho) que geraram uma curva monotônica.

A síntese de ALP se manteve relativamente estável no intervalo das concentrações 0-1mM e aumentou de forma expressiva para as concentrações de Th de 5-10mM. Da mesma forma Hewson & Fardy (1993) <sup>23</sup> observaram um aumento na concentração sérica de ALP em trabalhadores expostos a Th mas, nesse caso, tratava-se provavelmente da ALP hepática ou uma mistura das duas, hepática e óssea.

A síntese de OC se encontra significativamente aumentada em todas as concentrações usadas. Pesquisas realizadas em ratos expostos a urânio, classe dos actínídeos, também detectaram aumento na síntese da OC <sup>91,92</sup>.

#### **4.2.2 Cério**

Em decorrência da exposição de células osteoblásticas ao Ce, também foi observada uma curva dose-resposta em forma de sino mostrando que concentrações do metal iguais ou inferiores a 1mM resultaram em estímulo significativo à proliferação celular. Este resultado pode ter sido decorrente do efeito antioxidante dos íons Ce, conforme ensaios realizados em leucócitos <sup>86</sup>, ou uma resposta característica de osteoblastos expostos a lantanídeos <sup>93</sup>. No intervalo de 5-10mM observou-se redução significativa da proliferação celular. A redução na proliferação está em acordo com os resultados obtidos por Feyerabend et al (2010), que analisou o efeito de Ce e La e outras

terras raras em ligas de magnésio degradáveis para aplicações biomédicas em três modelos celulares, incluindo osteoblastos <sup>81</sup>.

Quanto à síntese de ALP pelos osteoblastos, foi observado aumento significativo na síntese da enzima a partir da concentração de 5mM, da mesma forma que na presença de magnésio e estrôncio em biomateriais <sup>38,39,93</sup> e semelhante à resposta apresentada pelas células tronco mesenquimais <sup>93</sup>.

A síntese de OC por células osteoblástica tratadas com Ce revelou aumento significativo, coerente com o efeito de estímulo dos osteoblastos mencionado também para ALP <sup>38,39</sup>. Da mesma, forma outras pesquisas também observaram uma relação entre a presença de Ce em substratos e o estímulo da OC e consequente formação óssea. Bigi et al (2009), ao desenvolver películas de revestimento para substratos de titânio usados em próteses contendo Ce, observou o aumento na síntese de OC e outras proteínas envolvidas na diferenciação óssea assim como a inibição da proliferação de osteoclastos <sup>94</sup>. Liu et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes ao estudar os efeitos do Ce sobre células mesenquimais <sup>93</sup>.

### **4.2.3 Lantânio**

A presença de La na cultura de osteoblastos mostrou que os dados de proliferação também apresentam curva dose-resposta em forma de sino. Concentrações iguais ou inferiores a 1mM resultaram em estímulo significativo. As concentrações variando de 1-10mM exibiram efeito negativo sobre a proliferação, semelhante ao resultado observado na viabilidade de células Jurkat.

Os resultados relativos à síntese de ALP e OC foram bastante semelhantes aos resultados obtidos com a exposição ao Ce.



#### 4.2.4 Desfechos

Os resultados apresentados sugerem que Th, Ce e La atuam de forma semelhante sobre os osteoblastos no que tange ao desfecho proliferação, síntese de ALP e OC. Este fato pode ser atribuído à semelhança química entre os grupos de actinídeos e lantanídeos<sup>29</sup>. No entanto, foi observada uma maior semelhança no padrão de síntese de OC em presença de Ce e La provavelmente devido a estes dois metais pertencerem ao mesmo grupo químico (lantanídeos).

Os indicadores de diferenciação celular sugerem que os três metais, e mais fortemente Ce e La, foram capazes de estimular a diferenciação de osteoblastos. Resumindo o conjunto de dados obtidos após a aplicação dos três metais e analisando os desfechos proliferação, síntese de ALP e OC, observou-se que:

- Para a concentração de 1mM de Ce e La foram encontrados: os maiores valores de proliferação das células osteoblásticas, os valores mais baixos de síntese de ALP, ao mesmo tempo em que foram obtidos os maiores valores de síntese da OC.

O aumento da proliferação associado à síntese de OC mais intensa provavelmente sugere uma condição favorável de crescimento ósseo. Para a mesma concentração o Th apresentou apenas os maiores valores para proliferação.

- Para as concentrações entre 5 e 10mM dos três metais foram observados: a redução progressiva da proliferação e os valores mais elevados para síntese de ALP e OC (exceto para o Th).

Estes resultados sugerem estresse celular pela inibição do crescimento celular e ao mesmo tempo o aumento expressivo da síntese de enzimas ligadas à diferenciação dos osteoblastos em osteócitos e o processo de mineralização da matriz extracelular. São dados interessantes para se investigar em modelos animais de forma a perceber as consequências de evento semelhante sobre em organismos vivos.

Pesquisas realizadas na área de odontologia e ortopedia investem na pesquisa sobre diferentes revestimentos e ligas empregados em prótese que melhorem a proliferação e a adesão celular às mesmas. Deste modo, vários resultados encontrados

com a aplicação de outros metais em ligas ou na dopagem da hidroxiapatita mostraram efeitos semelhantes aos encontrados neste trabalho <sup>34,37,39</sup>. A capacidade do La e do Ce em estimular a diferenciação de osteoblastos *in vitro* está de acordo com os resultados apresentados por Wang et al. (2008) e Liu et al. (2012) <sup>34,93</sup>.

De forma semelhante, em músculo liso de ratos foi observado que íons La poderiam deslocar e substituir os íons Ca superficiais nos sítios de ligação e prevenir a absorção de Ca em vários sítios celulares <sup>95-97</sup>. Os lantanídeos também podem ser depositados na superfície óssea onde substituem o cálcio <sup>29</sup>. É possível que íons La tenham outros efeitos além daqueles que diretamente afetam os íons cálcio <sup>95</sup>. Esta propriedade vem sendo explorada na confecção de biomateriais contendo La.

A diferenciação de osteoblastos está associada ao aumento da síntese de fosfatase alcalina nas fases iniciais da cultura, seguido da síntese de osteocalcina na fase de mineralização <sup>39,98</sup>. Na clínica médica o aumento destas enzimas normalmente está associado ao crescimento e reconstrução óssea, mas pode ser também consequência do desenvolvimento de alguns tipos de câncer <sup>99</sup>.

Estudo feito com a apatita dopada com La sugere que o biomaterial resultante tenha potencial de aplicação no desenvolvimento de um novo tipo de produto de revestimento bioativo para implantes metálicos <sup>100</sup>. Ensaio feito utilizando culturas de osteoblastos mostraram que o composto fosfato de La pode desempenhar o papel de uma boa base para adesão destas células de forma semelhante ao que ocorre com as biocerâmicas <sup>101</sup>.

Tanto os elementos minerais como os elementos orgânicos da matriz óssea podem mediar a ligação de cátions ao osso e responder pelas interações que ocorrem em nível molecular. A complexidade desta matriz e o elevado número de interações químicas possíveis tornam a racionalização do comportamento *in vivo* muito difícil, mas fundamental. Em primeiro lugar, actinídeos e lantanídeos se ligam de forma estável, na condição *in vitro*, a vários fosfatos de Ca como hidroxiapatita sintética ou ortofosfatos de Ca. Segundo, os elementos orgânicos da matriz óssea também podem participar da formação de complexos com os metais. As interações ocorrem simultaneamente e a sua importância relativa depende da especiação dos elementos no sangue <sup>29</sup>.

A adesão dos osteoblastos à superfície das placas pré-tratadas com os metais em três concentrações diferentes mostrou um resultado que veio a confirmar uma observação feita na prática, no início do projeto: as células em cultura, em presença de Ce e La apresentaram uma força de adesão superior ao grupo controle.

Os ensaios realizados mostraram que 0,1mM é uma concentração que nas primeiras duas horas apresentam maior estímulo para a adesão celular. Esse efeito depois é superado pelo grupo controle. Mesmo observando-se esse reverso nos resultados foi importante perceber que os metais interferiram no processo de adesão dos osteoblastos, provavelmente através de trocas iônicas com a matriz orgânica e inorgânica do substrato<sup>29</sup>.

#### **4.2.5 Interações**

Alguns compostos têm múltiplos alvos ou alvos em múltiplas vias, o que faz com que apresentem curvas dose-efeito em forma de sino. Ativação e inibição de agentes químicos e físicos devem ser analisadas separadamente<sup>74</sup>. Nesse caso foi escolhida a vertente relativa à inibição da proliferação, compreendida no intervalo das concentrações 1-10mM. Para a análise dos efeitos da mistura Th+La em células Jurkat, todos os pontos de leitura encontrados puderam ser inseridos no programa CompuSyn porque as curvas dose-resposta tanto do Th como do La apresentaram forma monotônica.

No caso dos osteoblastos que apresentaram curvas em forma de sino para proliferação e forma em U para fosfatase alcalina, foi necessário usar somente a informação contida nas vertentes de inibição (proliferação) e ativação (ALP). Para esses casos foi escolhido a leitura de efeito correspondente à concentração de 5mM de cada metal usado de forma isolada para em seguida avaliar o efeito das misturas (5+5)mM de cada uma das seis combinações testadas.

A síntese de OC apresentou resultados equivalentes a múltiplos do valor encontrado no grupo controle. Assim sendo, os dados não atendiam às condições do programa CompuSyn e por esse motivo foi usado a análise pelo modelo de Loewe. O

efeito de referência escolhido foi aquele equivalente à duplicação do valor observado no grupo controle.

A análise dos resultados da interação para os três bioindicadores referentes à fisiologia de osteoblastos indica:

1. A presença de sinergismo no desfecho proliferação para duas combinações (Th+La e Th+Ce) e efeito aditivo ou não-interação para a combinação Ce+La;
2. A presença de antagonismo leve, relativo à síntese de ALP, para as combinações Th+Ce e Ce+La, e efeito aditivo para a combinação Th+La;
3. A presença de um forte antagonismo revelado por todas as misturas testadas para a síntese de OC.

Considerando-se um cenário de incorporação do Th, o fato do elemento ter uma extensa meia vida e a sua característica de metal radioativo, faz com que a radioatividade possa ser também um possível fator de interferência no processo de interação como um todo, em acordo com o documento da USEPA sobre misturas químicas <sup>51,102</sup>. Embora alguns riscos potenciais presentes no ambiente envolvam a exposição significativa a apenas um único composto, na maioria dos casos de contaminação ambiental há exposições concomitantes ou sequenciais a uma combinação de fatores que podem induzir efeitos semelhantes ou diferentes ao longo de períodos de exposição variando de curto a longo prazo <sup>103</sup>. Ainda que Th e La, em suas formas isoladas, sejam considerados elementos com uma baixa toxicidade para o modelo de linfócitos T humano utilizado, são importantes que os efeitos das interações entre estes elementos químicos e a radiação sejam pesquisados.

É importante também que se analisem todos os componentes presentes durante a extração, ou processamento de monazita e seus derivados, que possam afetar os profissionais da mineração envolvidos. Na natureza, o Th encontra-se associado a outros actínídeos e a elementos do grupo dos lantanídeos e, durante seu processamento, com produtos químicos orgânicos e inorgânicos bem como ácidos e bases. Portanto, os efeitos para a saúde do profissional, decorrentes da exposição ocupacional, não podem ser atribuídos exclusivamente à sua radioatividade; distintos aspectos como a sua associação a outras substâncias também devem que ser considerados, como demonstrado neste trabalho.

## 5 Conclusão

Dentre os efeitos dos metais empregados de forma isolada sobre células Jurkat (modelo de linfócitos T humanos), observou-se que Th e Ce, apresentados de forma isolada às células, não causaram efeitos tóxicos nas condições experimentais utilizadas. Já o La gerou redução na proliferação das células Jurkat.

Quanto aos osteoblastos, foi observado que a exposição de células aos três metais originou uma curva dose-resposta em forma de sino, mostrando que os efeitos sobre a proliferação podem ser de ativação ou inibição, em função da dose utilizada. Concentrações iguais ou inferiores a 1mM produziram estímulo à proliferação celular e concentrações entre 1-10mM exibiram efeito negativo sobre a proliferação.

Os indicadores de diferenciação celular sugerem que, nas concentrações mais elevadas, os três metais, e mais fortemente Ce e La, foram capazes de estimular a diferenciação de osteoblastos expressa pela síntese de ALP e OC. Os lantanídeos também interferiram no processo de adesão dos osteoblastos ao substrato.

Tanto para os modelos de linfócitos T como de osteoblastos observou-se a existência de interações químicas entre diversas combinações testadas. Dependendo da mistura e do desfecho avaliado as interações, quando presentes, podiam variar entre sinergismo e antagonismo.

Com relação aos efeitos dos metais em misturas binárias sobre células Jurkat, a mistura de La e Th evidenciou a intensificação do efeito do La em presença de Th, que resultou em uma redução significativa na proliferação celular. Foi observado também que o sinergismo foi mais acentuado em presença das concentrações mais baixas dos metais da mistura.

Relativamente aos osteoblastos e considerando o desfecho proliferação, observou-se sinergismo para as combinações (Th+La) e (Th+Ce) e efeito aditivo ou não-interação para as combinações restantes. Com relação à síntese de ALP observou-se um antagonismo leve para as misturas (Th+Ce) e (Ce+La) e para síntese de OC observou-se um forte antagonismo em todas as combinações binárias utilizadas.

Th, Ce e La provocaram respostas diferentes sobre os indicadores pesquisados, que variaram com o modelo de célula escolhido, com as concentrações aplicadas e com as combinações binárias dos metais testadas.

O sinergismo mais intenso observado na inibição de viabilidade de células Jurkat, para as concentrações mais baixas de Th e La, demonstra um efeito relevante para a avaliação de risco ocupacional, pois doses baixas são mais representativas da exposição ocupacional a qual os trabalhadores estão normalmente submetidos.

## **5.1 Considerações finais e perspectivas futuras**

As implicações toxicológicas das interações químicas têm sido reconhecidas como importante problema de saúde pública. A alta propensão para a exposição simultânea de múltiplas substâncias requer mais estudos do que o existente atualmente, de forma a proporcionar um melhor conhecimento sobre os efeitos biológicos causados pelas misturas de agentes químicos e físicos.

Exposição ao Th e sua incorporação representará sempre um risco para o homem, devido às características deste elemento radioativo e pelo fato de seu decaimento ocorrer principalmente através da emissão de partículas alfa de alta energia. Estes aspectos todos tem um papel preponderante sobre possíveis efeitos estocásticos da radiação.

Para a análise de risco e políticas de saúde pública, é importante ter presente que o potencial radioativo do Th não é o único aspecto relevante a ser considerado. Para a saúde do trabalhador e em particular para a avaliação e gerenciamento de risco, o tema de exposições a agentes químicos sob a forma isolada, ou em associação, é uma questão crítica que pode suscitar diferentes respostas. Um elemento químico entra em contato com o organismo com distintas configurações: espécies químicas, estado físico, em mistura ou isolado. Estas configurações podem resultar em efeitos biológicos distintos.

Levando-se em conta a complexidade do tema, o desenvolvimento deste trabalho foi focado em questões bastante específicas da toxicidade do Th, Ce e La em células humanas e a importância das interações químicas como fator também a ser considerado.

Dessa forma, recomenda-se o desenvolvimento de novos estudos que permitam ampliar o poder de avaliação de risco para profissionais expostos a agentes químicos e físicos:

- Identificação das substâncias integrantes das misturas presentes no ar do ambiente de trabalho;
- Usar esta informação para desenvolver estudos *in vitro* que permitam conhecer os efeitos das misturas em modelos de células representativas dos órgãos alvo;
- Alimentar o modelo usado pelo software com os dados para obtenção dos parâmetros necessários à construção das curvas dose-efeito;
- Validar o modelo gerado;
- Realização de estudos que incluam em seu planejamento os resultados obtidos pelo modelo.

Futuras pesquisas poderão ser delineadas reunindo diferentes abordagens como estudos *in vitro*, epidemiológicos e de modelagem. Levando-se em consideração os metais estudados neste projeto e os resultados apresentados, seria interessante investigar alterações na densidade óssea de trabalhadores envolvidos na mineração e no beneficiamento destes metais. Há uma forte indicação que a densidade óssea seja um possível indicador de efeito.

Resultados como estes poderão influir nas decisões normativas futuras que regulem a exposição do profissional ao Th e outros agentes químicos e físicos sob uma nova ótica.

## 6 Referências

1. Amorim A. Os biomarcadores e a sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos e ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2003(6):158-170.
2. Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB. Cytokine Production by Human Airway Epithelial Cells after Exposure to an Air Pollution Particle Is Metal-Dependent. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;146(2):180-188.
3. Liao T-T, Shi Y-L, Jia J-W, Wang L. Sensitivity of Different Cytotoxic Responses of Vero Cells Exposed to Organic Chemical Pollutants and their Reliability in the Bio-toxicity Test of Trace Chemical Pollutants. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2010;23(3):219-229.
4. Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 2010;31(2):135-148.
5. Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;592(1-2):119-137.
6. Ahamed M, Singh S, Behari JR, Kumar A, Siddiqui MK. Interaction of lead with some essential trace metals in the blood of anemic children from Lucknow, India. *Clin Chim Acta*. 2007;377(1-2):92-97.
7. Zwolak I, Zaporowska H. Selenium interactions and toxicity: a review. Selenium interactions and toxicity. *Cell Biol Toxicol*. 2012;28(1):31-46.
8. Choudhury H, Mudipalli A. Potential considerations & concerns in the risk characterization for the interaction profiles of metals. *Indian J Med Res*. 2008;128(4):462-483.
9. Albert R, Klewin P, Fresco J, Harley J, Harris W, M E. Industrial, Higiene and medical survey of thorium refinery. *Arch. Ind. Hlth*. 1955;11:8.
10. Evans CH. Interesting and useful biochemical properties of lanthanides. *Trends in Biochemical Sciences*. 1983;8(12):445-449.
11. Abrão A. *Química e Tecnologia das Terras-Raras*. Rio de Janeiro 1994.
12. CNEN. Serviços de Radioproteção. In: Nuclear CNdE, ed. *Normas Técnicas: DOU 01/08/1988*; 1988.



13. Rocio M, Silva M, Carvalho P, Cardoso J. Terras-raras: situação atual e perspectivas. *BNDES*. 2012;35.  
[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3511.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3511.pdf).
14. Nogueira D. País quer explorar substâncias usadas em iPod e mísseis, num mercado de US\$ 9 bilhões. *O Globo*. 30/01/2011, 2011;economia: 35.
15. Martins T, Isolani P. Rare earths: Industrial and biological applications. *Quimica Nova*. 2005:111-117.
16. Sokolov F, Fukuda K, Nawada H. *Thorium fuel cycle - Potential benefits and challenges*. AIEA, Viena 2005 2005. 92-0-103405-9.
17. Travis L, Land C, Andersson M, et al. Mortality after cerebral angiography with or without radioactive thorotrast: An international cohort of 3,143 two-year survivors. *Radiation Research*. 2001:136-150.
18. Bronner F, Slepchenko B, Pennick M, Damment S. A model of the kinetics of lanthanum in human bone, using data collected during the clinical development of the phosphate binder lanthanum carbonate. *Clinical Pharmacokinetics*. 2008:543-552.
19. Stellman JM. Toxicocinetic. In: Office IL, ed. *Encyclopaedia of occupational health and safety*. Vol 1. Geneve: International Labour Office; 1998.
20. Clarkson T. Health effects of metals: a role for evolution? *Environ Health Perspect*. 1995;103 Suppl 1:9-12.
21. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*. 2008;82(8):493-512.
22. Oga S, Camargo M, Batistuzzo J. *Fundamentos de Toxicologia*. 3rd. ed. São Paulo, SP2008.
23. Hewson G, Fardy J. Thorium metabolism and bioassay of mineral sands workers. *Health Physics*. 1993:147-156.
24. Farid I, Conibear S. Hepatic-function in previously exposed thorium refinery workers as compared to normal controls from the health and nutrition survey. *Health Physics*. 1983:221-230.
25. Hallegot P, Galle P. Microanalytical study of th-232 deposits in bone-marrow and liver. *Radiation and Environmental Biophysics*. 1988:67-78.

26. Berry J, Zhang L, Galle P, Ansoborlo E, HengeNapoli M, DonnadiouClaraz M. Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification. *Microscopy Research and Technique*. 1997:313-323.
27. Chen X, Cheng Y, Rong Z. Recent results from a study of thorium lung burdens and health effects among miners in China. *J Radiol Prot*. 2005;25(4):451-460.
28. Ibrahim S, Wrenn M, Singh N, Cohen N, Saccomano G. Thorium concentration in human-tissues from 2 united-states populations. *Health Physics*. 1983:213-220.
29. Vidaud C, Bourgeois D, Meyer D. Bone as target organ for metals: the case of f-elements. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(6):1161-1175.
30. Lariviere D, Packer A, Marro L, Li C, Chen J, Cornett R. Age dependence of natural uranium and thorium concentrations in bone. *Health Physics*. 2007:119-126.
31. Taylor M T, Leggett W. A generic biokinetic model for predicting the behaviour of the lanthanide elements in the human body. *Radiation Protection Dosimetry*. 2003;105:193-198.
32. Kierszenbaum A. *Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia*. 2nd. ed. Rio de Janeiro, Brazil2088.
33. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-139.
34. Wang X, Yuan L, Huang J, Zhang TL, Wang K. Lanthanum enhances in vitro osteoblast differentiation via pertussis toxin-sensitive gi protein and ERK signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2008;105(5):1307-1315.
35. Thomas R, Lie R, Scott J. Thorium distribution and excretion studies I. Patterns Following Parenteral Administration. *Health Physics*. 1963;9(2):153-163.
36. Boecker B, Thomas R, Scott J. Thorium distribution and excretion studies II. *Health Physics*. 1963;9(2):165-176.
37. Bracci B, Torricelli P, Panzavolta S, Boanini E, Giardino R, Bigi A. Effect of Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2009;103(12):1666-1674.
38. Capuccini C, Torricelli P, Sima F, et al. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(6):1885-1893.

39. Boanini E, Torricelli P, Fini M, et al. Magnesium and strontium doped octacalcium phosphate thin films by matrix assisted pulsed laser evaporation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;107(1):65-72.
40. Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3rd. ed. New York. USA1994.
41. Gey O, Coffmann D, Kubicek T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*. 1952;12:364-365.
42. Rosenbluth SA, Weddington GR, Guess WL, Autian J. Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. *J Pharm Sci*. 1965;54:156-159.
43. ATCC, American Type Culture Collection.  
[http://www.atcc.org/Documents/Product\\_Use\\_Policy/Commercial\\_Use.aspx](http://www.atcc.org/Documents/Product_Use_Policy/Commercial_Use.aspx).
44. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1-6.
46. Klaassen C. *Casarett and Doulls Toxicology*. 7th. ed. New York: McGraw Hill; 2007.
47. Flora S, Mittal M, Pachauri V, Dwivedi N. A possible mechanism for combined arsenic and fluoride induced cellular and DNA damage in mice. *Metallomics*. 2012;4(1):78-90.
48. Calabresi EJ. *Multiple Chemical Interactions (Toxicology and Environmental Health Series)*. 1 ed. Chelsea, USA: Lewis Publisher; 1991.
49. Calabrese J. *Multiple Chemical Interactions*. Chelsea, Michigan1991.
50. Bliss I. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*. 1939;26(3).
51. EPA. *Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures*. Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency; September 1986 1986.
52. Calabresi E. Toxicological consequences of multiple chemical interactions: a primer. *Toxicology*. 1995;105:121-135.
53. Goldoni M, Tagliaferri S. Dose-response or dose-effect curves in in vitro experiments and their use to study combined effects of neurotoxicants. *Methods Mol Biol*. 2011;758:415-434.

54. Hertzberg R, Teuschler L. Evaluating quantitative formulas for dose-response assessment of chemical mixtures. *Environ Health Perspect.* 2002;110 Suppl 6:965-970.
55. Loewe S. Antagonisms and antagonists. *Pharmacological Reviews.* 1957;9(2):237-242.
56. Gessner P. Isobolographic analysis of interactions: An update on applications and utility. *Toxicology.* 1995;105(2-3):161-179.
57. Tagliaferri S, Caglieri A, Goldoni M, et al. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro.* 2010;24(1):116-122.
58. Borgert C, Price B, Wells C, Simon G. Evaluating chemical interaction studies for mixture risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment.* 2001:259-305.
59. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):621-681.
60. Paiva A, Oliveira M, Yunes S, Oliveira L, Cabral-Neto J, Almeida C. Effects of Lanthanum on Human Lymphocytes Viability and DNA Strand Break. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 2009;82:423-427.
61. Shan SY. Comparative toxicity of soluble and insoluble compounds of thorium-232. In: Lefavet K, eds., ed. *The toxicology of radioactive substances.* Vol 4. New York: Pergamon Pre; 1970:9-19.
62. Duke R, Witter R, Nash P, Young J, Ojcius D. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *FASEB J.* 1994;8(2):237-246.
63. Gorman A, Samali A, McGowan A, Cotter T. Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry.* 1997;29(2):97-105.
64. Wolnicka-Głubisz A, Rijnkels J, Sarna T, Beijersbergen van Henegouwen G. Apoptosis in leukocytes induced by UVA in the presence of 8-methoxypsoralen, chlorpromazine or 4,6,4'-trimethylangelicin. *J Photochem Photobiol B.* 2002;68(2-3):65-72.

65. Collins A. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-261.
66. Tice R, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-221.
67. Collins A, Fleming I, Gedik C. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1219(3):724-727.
68. Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y, Sasaki Y. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res.* 1998;415(3):229-235.
69. Panayiotidis M, Collins A. Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. *Free Radic Res.* 1997;27(5):533-537.
70. Speit G, Henderson L. Review of the in vivo genotoxicity tests performed with styrene. *Mutat Res.* 2005;589(1):67-79.
71. Chorilli M, Tamascia P, Rossim C, Salgado H. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009;30(1)::19-30.
72. Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 2009;463:73-95.
73. *CompuSyn for Drug Combinations and for General Dose-Effect Analysis User's Guide* [computer program]. United States: ComboSyn, Inc.; 2005.
74. Chou TC. The mass-action law based algorithm for cost-effective approach for cancer drug discovery and development. *Am J Cancer Res.* 2011;1(7):925-954.
75. Tallarida RJ. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(1):1-7.
76. *CompuSyn software for drug combinations and for general dose effect analysis, and user's guide.* [computer program]. 2007.
77. Adamiec G, Aitken M. Dose-rate conversion factor: update. *Ancient TL.* 1998;16(2):37-51.
78. ICRP. *Nonstochastic Effects of Ionizing Radiation.* 1984.
79. Hirano S, Suzuki KT. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect.* 1996;104(Suppl 1).

80. Palmer R, Butenhoff J, Stevens J. Cytotoxicity of the rare-earth-metals cerium, lanthanum, and neodymium invitro - comparisons with cadmium in a pulmonary macrophage primary culture system. *Environmental Research*. 1987;142-156.
81. Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, et al. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(5):1834-1842.
82. Heffeter P, Jakupec M, Korner W, et al. Anticancer activity of the lanthanum compound [tris(1,10-phenanthroline)lanthanum(III)]trithiocyanate (KP772; FFC24). *Biochemical Pharmacology*. 2006:426-440.
83. Liu Y, Chen D, Chen A, Liu B, Sun S, Nie Y. Subchronic toxicity of lanthanum nitrate on liver in rats. *Journal of Rare Earths*. 2002:565-569.
84. Liu H, Yuan L, Yang X, Wang K. La(3+), Gd(3+) and Yb(3+) induced changes in mitochondrial structure, membrane permeability, cytochrome c release and intracellular ROS level. *Chem Biol Interact*. 2003;146(1):27-37.
85. Kumar A, Mishra P, Ghosh S, et al. Thorium-induced oxidative stress mediated toxicity in mice and its abrogation by Diethylenetriamine pentaacetate. *International Journal of Radiation Biology*. 2008;84(4):337-349.
86. Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen J, Traversa E, Ghibelli L. Ce(3+) Ions Determine Redox-Dependent Anti-apoptotic Effect of Cerium Oxide Nanoparticles. *Acs Nano*. 2011;5(6):4537-4549.
87. Celardo I, Pedersen J, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2011;3(4):1411-1420.
88. Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*. 2009;5(24):2848-2856.
89. Vettori MV, Goldoni M, Caglieri A, et al. Antagonistic effects of methylmercury and PCB153 on PC12 cells after a combined and simultaneous exposure. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44(9):1505-1512.
90. Lizon C, Fritsch P. Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages: an in vitro study. *International Journal of Radiation Biology*. 1999:1459-1471.
91. Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect*. 2005;113(1):68-72.

92. Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K. Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry*. 2006;118(3):307-314.
93. Liu DD, Zhang JC, Zhang Q, Wang SX, Yang MS. TGF- $\beta$ /BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2012.
94. Bigi A, Boanini E, Capuccini C, et al. Biofunctional alendronate–Hydroxyapatite thin films deposited by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. *Biomaterials*. 2009;30(31):6168-6177.
95. Weiss GB, Goodman FR. Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution and Ca45 movements in intestinal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1969;169(1):46-55.
96. Goodman FR, Weiss GB. Dissociation by lanthanum of smooth muscle responses to potassium and acetylcholine. *Am J Physiol*. 1971;220(3):759-766.
97. Goodman FR, Weiss GB. Effects of lanthanum on 45 Ca movements and on contractions induced by norepinephrine, histamine and potassium in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1971;177(2):415-425.
98. Banfi G, Lombardi G, Colombini A, Lippi G. Bone metabolism markers in sports medicine. *Sports Med*. 2010;40(8):697-714.
99. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol*. 2008;196(3):601-613.
100. Guo DG, Wang AH, Han Y, Xu KW. Characterization, physicochemical properties and biocompatibility of La-incorporated apatites. *Acta Biomater*. 2009;5(9):3512-3523.
101. Ergun C, Liu H, Webster TJ. Osteoblast adhesion on novel machinable calcium phosphate/lanthanum phosphate composites for orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89(3):727-733.
102. Obe G., Vijayalaxmi. Chromosomal Alterations - Methods, Results And Importance In Human Health. Berlin Heidelberg, 2007.
103. EPA, Choudhury H, Hertzberg R, et al. *Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures*. Washington, DC: Risk Assessment

Forum, U.S. Environmental Protection Agency; Aug 2000 2000. EPA/630/R-00/002.



## 7 Artigo publicado

Archives of Environmental & Occupational Health

DOI: 10.1080/19338244.2012.719557

### **The Role of Chemical Interactions between Thorium, Cerium and Lanthanum in Lymphocyte Toxicity**

Thorium, Cerium and Lanthanum Interaction

Monica S.Oliveiraa \*, Isabelle M.Duarte a, Amanda V.Paiva a, Samira N.Yunes a,  
Carlos E.Almeida a, Rita C.Mattos b, Paula N.Sarcinelli b.

a Radioprotection and Dosimetry Institute, CNEN, Av. Salvador Allende s/n, CEP 22780-160, RJ, Brazil. b Public and Environmental Health Program, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, CEP 21041-210, RJ, Brazil

Corresponding author- Monica S. Oliveira, *m.stuck@yahoo.com.br*

#### **Abstract**

Thorium, cerium and lanthanum are metals present in several types of minerals, the most common of which is monazite. Cerium and lanthanum are elements in the lanthanides series. Thorium, an actinide metal, is a hazardous element due to its radioactive characteristics. There is a lack of information describing the possible chemical interactions among these elements and the effects they may have on humans. Tóxicological analyses were performed using cell viability, cell death and DNA damage assays. Chemical interactions were evaluated based on the Loewe additivity model. The results indicate that thorium and cerium individually have no toxic effects on lymphocytes. However, thorium associated with lanthanum increases the toxicity of this element, thereby reducing the viability of lymphocytes at low concentrations of metals in the mixture.

## Keywords

Chemical interactions - metals - lymphocytes - toxicity - thorium – monazite

## INTRODUCTION

Humans are simultaneously exposed to mixtures of many different chemicals, rather than to individual chemicals. Thus, exposure to chemical mixtures is an environmental reality. It is important to study distinct types of mixtures as well as the many factors that impact the overall toxicities of the mixtures for health risk assessment. There has been growing interest in studying the interactions among environmental toxicants<sup>1,2</sup>.

Mineral exploration industry workers are subject to internal exposure to metals. The main health concern for workers that extract and process thorium (Th) is that this metal is radioactive and decays via emission of alpha particles. In studies related to the toxic effects of thorium, the observations are usually associated with radioactivity<sup>3-5</sup>. However, it is also important to understand the chemical risks of thorium mixtures that impact overall toxicity issues that are relevant for health risk assessments. Cerium (Ce) and lanthanum (La) are two metals that are commonly associated with thorium.

Thorium is a naturally occurring radioactive metal in the actinide series of metals. Cerium and lanthanum are members of the lanthanide series of metals. Thorium, cerium and lanthanum occur in association with different types of several minerals; one of the most common of these is monazite. Monazite deposits are subject to exploitation in a number of countries. Lanthanides and actinides have gained importance in the international market due to their commercial applications, and Brazil has played an important role in this increased importance. Thorium, cerium and lanthanum have various industrial applications, and thorium is also a potential source of nuclear fuel<sup>6</sup>.

Performing toxicological and risk assessments on chemical mixtures is difficult. Toxicants may interact to produce additive, synergistic or antagonistic responses at a biological site<sup>7</sup>. The available data on the toxicology of thorium and lanthanides are not sufficient because these elements are often present as mixtures. Some epidemiological studies have been performed in humans, and studies on the mechanism of action and

toxicity of thorium have been performed mostly in small mammals. In most cases, the observed toxicities are related to the radioactive decay of thorium<sup>1-3</sup>.

In 1939, Bliss described important roles of chemical interactions<sup>8</sup>. In 1989, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) listed the potential effects of mixtures on human health, thereby recognizing the importance of this issue. This document was revised in 2000 as “Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Interactions”<sup>9</sup>. The subject has also been highlighted by other authors<sup>1,10,11</sup> and is gradually gaining prominence in the field of toxicology.

The first objective of this work was to study the biological responses of human lymphocytes exposed to thorium and cerium. In this case, the null hypothesis predicts that the two metals do not affect the viability of lymphocytes in culture. The second objective was to investigate the possibility of chemical interactions among thorium, cerium and lanthanum based on the no-interaction hypothesis

## MATERIALS AND METHODS

Critical exposure conditions were analyzed based on viability, apoptosis or necrosis, and DNA damage. Chemical interactions were evaluated via the additivity model<sup>2</sup>. A common commercial form of thorium is nitrate. Therefore, to apply a standardized procedure, the three elements were used in the form of nitrates.

### Lymphoblastoid cells

Jurkat cells, a human T-lymphocyte leukemia cell line (BCRJ no: CR063, Rio de Janeiro Cell Bank, RJ, Brazil), were used for all toxicology experiments. The cells were maintained in RPMI 1640, pH 7.2, 50 mg/L gentamicin and 2 mg/L amphotericin B (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), supplemented with 10% fetal calf serum, (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), in culture flasks (Greiner Bio-One, São Paulo, SP, Brazil) and were incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in a humid atmosphere. The cell density was kept approximately between 2.0 x 10<sup>5</sup> and 1.0 x 10<sup>6</sup> cells/ml for all of the experiments.

## Test substances

Thorium nitrate PA (Merck, Darmstadt, Germany), cerium nitrate PA (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and lanthanum nitrate PA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) stock solutions were prepared by dissolving the crystals of these substances in sterile distilled water (MilliQ). They were then diluted a second time and added to the cells at pre-defined concentrations at a volume of 0.1% of the total culture volume.

In all of the experiments, the initial lymphocyte suspension was  $2.0 - 5.0 \times 10^5$  cells/ml. The thorium concentrations in the culture media ranged from 0 to 1 mM. Cells were scored 0, 24 and 48 hours after the addition of Th and Ce separately and after addition of the two mixtures Th+Ce+La and Th+La. For comet assays, samples were analyzed in 4- and 24-hour intervals. All experiments were performed three times. The negative controls were cultured in complete RPMI 1640 medium containing sterile distilled water, and the positive controls were cultured in complete RPMI 1640 medium containing  $150 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  for 1 hour<sup>12</sup>. The applied concentrations of each chemical were based on preliminary experiments.

When testing each element separately, the concentrations used varied from 0.0 to 1.0 mM for thorium and from 0.0 to 5.0 mM for cerium. The maximum concentrations employed in the experiments were determined based on the maintenance of the pH of the culture media similar to the controls. The Th, Ce and La mixture was added to cells according to the ratio of these elements detected in a sample of monazite collected from the city of Buena, RJ, Brazil. The first mixture, Ce+La+Th, was applied at concentrations of 0.00+0.00+0.00, 0.25+0.12+0.03, 0.50+0.24+0.06, 2.50+1.18+0.30 or 5.00+2.35+0.59 mM, while the second mixture contained 0.00+0.00, 0.39+0.10, 0.78+0.20, 1.17+0.29, 1.56+0.39, 1.95+0.49 or 2.34+0.59 mM La+Th, respectively.

## Viability assays

At the beginning of the experiments, *the* cell viability was determined based on exclusion of 0.4% trypan blue dye (Sigma-Aldrich)<sup>13</sup>, and the cells were counted with a hemocytometer to determine their concentration. The viability was always higher than 90%. In the course of the experiments, estimates of viability, necrosis and apoptosis

were performed using a morphological assay with acridine orange and ethidium bromide. This type of assay provides a convenient way of quantifying apoptotic and necrotic cells within the same cell population via fluorescent microscopy. Cells were dyed using one microliter of a mixture of 100 µg/ml acridine orange (AO) and 100 µg/ml ethidium bromide (EB) in 25 µl cell culture samples on clean microscope slides<sup>14,15</sup>. Fluorescent cells were scored under a ZEISS Axioplan microscope at 400X magnification. Cells were classified based on the morphology and colors observed. Viable cells had green nuclei with a normal appearance; apoptotic cells had green or orange nuclei that appeared fragmented or condensed; and necrotic cells had orange nuclei that appeared normal. Two hundred cells were scored per sample, according to Wolnicka-Głubisz<sup>16</sup>.

Initially, the elemental toxicity was determined based on survival curves. The maximum metal concentrations were fixed as a function of the stability of the pH of the cell culture media. Therefore, the maximum mortality reference value used was a lethal dose LD30. Hence, LD10, LD20 and LD30 were used to compare the cells after exposure to the metals, either alone or in combination.

### **Genotoxic assay**

Potential induced genotoxic effects were measured using the comet assay or single-cell gel electrophoresis (SCGE) to identify DNA strand breaks. This assay can be used to detect DNA damage caused by double or single strand breaks, alkali labile sites, oxidative base damage, and DNA cross-linking<sup>17</sup>. The SCGE assay was performed under alkaline conditions<sup>18</sup>. Comet images were analyzed by visual scoring with a ZEISS Axioplan fluorescence microscope. One hundred cells were scored per experiment, with fifty cells being scored on each of two replicate slides<sup>19</sup>, and the comet images were classified into one of five categories. Each category represented the relative tail intensity and, thus, increasing degrees of DNA damage<sup>20,21</sup>. The percentages of damaged DNA were converted to arbitrary units<sup>22</sup>. Samples were collected 4 and 24 hours after addition of the metals, as most of the DNA alterations detected with this method are considered to be short-lived; i.e., they are quickly repaired<sup>23</sup>.

## Chemical interactions

In analyzing chemical interactions, doses that induce the same effects are referred to as isoboles, a concept first introduced by Loewe in 1957. Isobolographic analysis provides a basis for evaluating whether the biological responses induced by mixtures are greater, the same, or lower than expected based on the activities of the individual components and the concept of dose additivity<sup>24</sup>. Chemical interaction estimates were obtained from experiments in which the effects of treatment with the same concentrations of drug A alone, drug B alone, or drugs A and B in combination produced the same effect. The interaction was measured based on the value of the interaction index, which is a quantitative marker. The interaction index, represented by  $\gamma$ , was defined by the following isobolar relationship:

$$[A]_{\text{mix}} / [A] + [B]_{\text{mix}} / [B] = \gamma \quad (1)$$

The variables [A] and [B] represent the concentrations of the metals used alone that result in a specific effect, and the variables  $[A]_{\text{mix}}$  and  $[B]_{\text{mix}}$  are the concentrations of the substances in a mixture. The quantities for formula (1) were obtained from the dose response curves of the examined substances alone or in mixtures. For the isobolographic analysis, when  $\gamma=1$ , the interaction is additive; when  $\gamma<1$ , it is synergistic; and when  $\gamma>1$ , it is antagonistic<sup>25</sup>.

## Statistical analysis

Statistical analyses were used to assess whether there were significant differences in the results obtained from treatment with the individual substances and the mixtures. The data were expressed as the mean values of three independent experiments plus or minus the standard deviation (SD). When appropriate, the data were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's method and the non-parametric Kruskal-Wallis test.

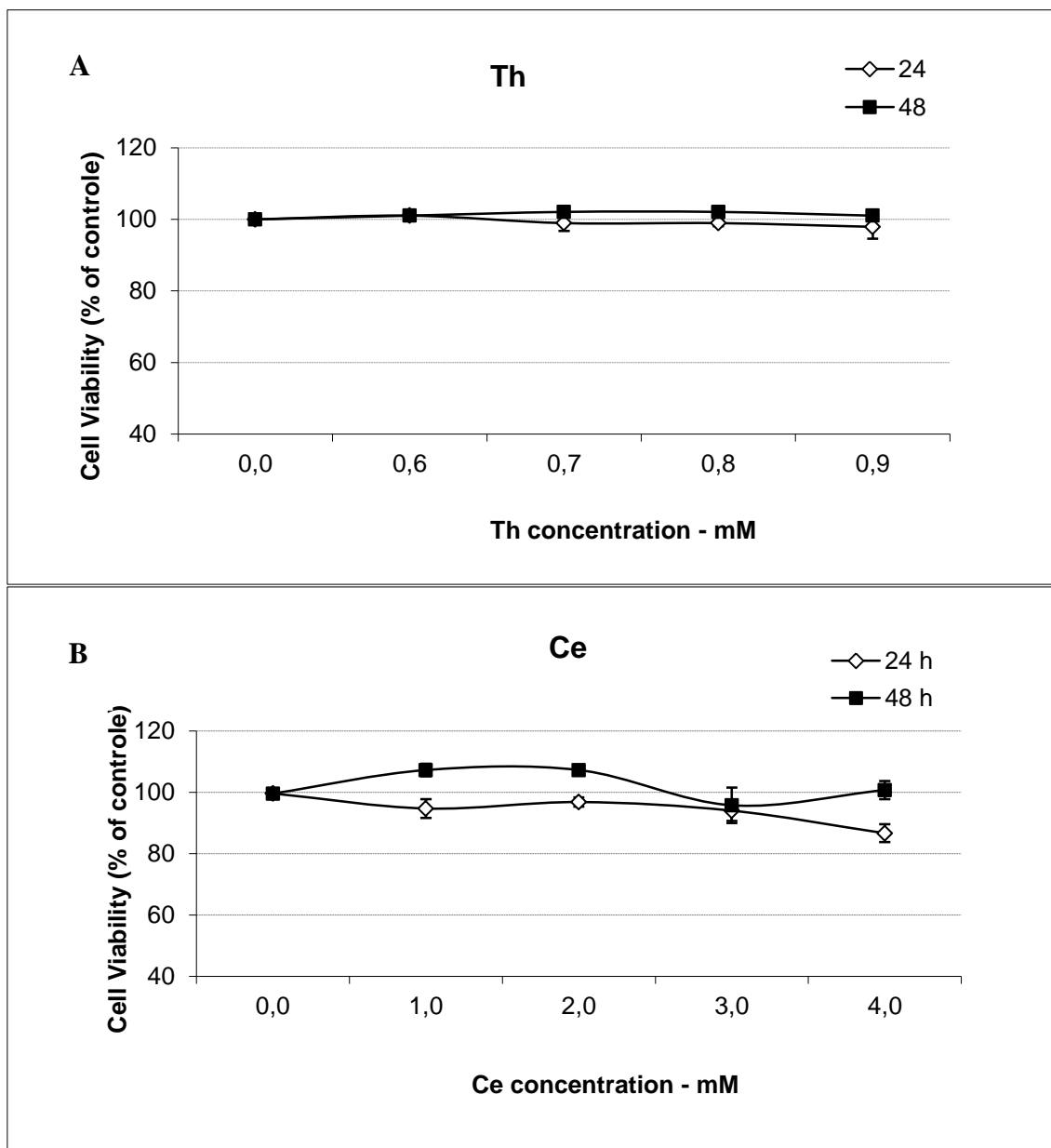
## RESULTS

The results demonstrated that under the experimental conditions applied in this study, thorium and cerium alone showed no toxic effects (Figure 1). The absorbed dose of thorium resulting from radioactive decay also had no effect on cell viability after 48 h of treatment. The thorium annual absorbed dose rate is equivalent to 0.136 mGy/ppm/year<sup>27</sup>. The highest concentration of thorium used in the experiments was 232 ppm, which corresponds to a dose of 31.55 mGy/year. When cells were treated with the Ce+La+Th mixture at the same ratio as found in Brazilian monazite, no change in lymphocyte viability was observed. However, the La+Th mixture led to decreased cell viability (Table 1).

The mode of cell death was analyzed in the cells treated with La+Th. There was a relative decrease in the frequency of apoptotic cells and an increase in the incidence of necrosis associated with increasing concentrations of the mixture (Figure 2). Analysis using the alkaline comet assay showed no significant changes in the DNA strand break profile in cells that were treated with thorium and cerium alone or the mixture of lanthanum and cerium (data not shown). These results suggest that a decrease in cell viability is a consequence of the cytotoxicity of the mixture.

The results reveal a chemical interaction between thorium and lanthanum. The isobolographic analyses are shown in Table 2. For LD10, LD20 and LD30, the Loewe index<sup>28</sup>, is lower than 1; however, the LD30 after 48 hours of exposure was approximately equal to 1, indicating no chemical interaction.

## FIGURES AND TABLES



**Fig. 1.** The effect of thorium (A) and cerium (B) on cell viability. Cells were treated for 24 (◇) and 48 (■) hours.

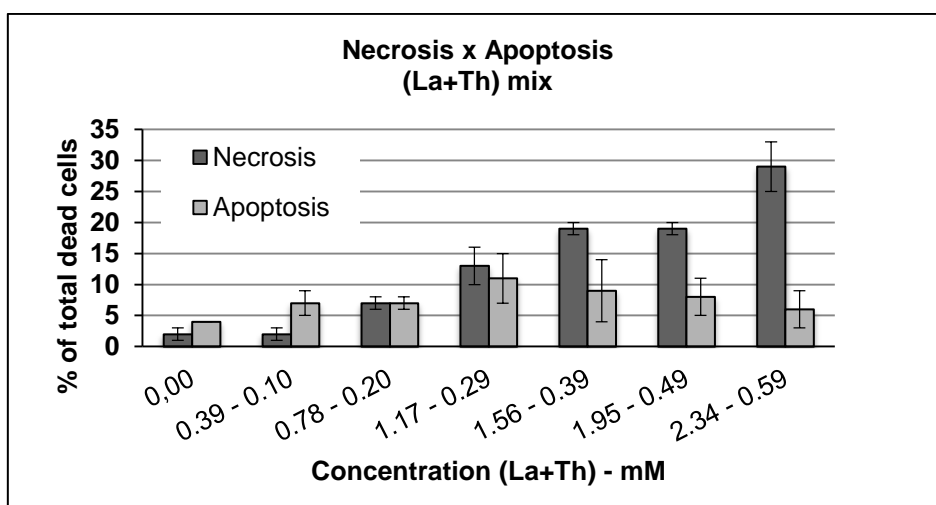


**Table 1. The effect of La+Th and Ce+La+Th Mixtures on cell viability after 24 and 48 Hours of Exposure.**

Mixtures	Element Concentration (mM)			Viability (% of control) <sup>a</sup>	
	Ce	La	Th <sup>b</sup>	24 h	48 h
<b>La + Th</b>		0.39	0.10	0.97 ± 0.04	0.99 ± 0.09
		0.78	0.20	0.91 ± 0.02	0.92 ± 0.03
		1.17	0.29	<b>0.81 ± 0.05</b>	0.84 ± 0.07
		1.56	0.39	<b>0.74 ± 0.03</b>	<b>0.81 ± 0.01</b>
		1.95	0.49	<b>0.78 ± 0.08</b>	<b>0.76 ± 0.01</b>
		2.34	0.59	<b>0.67 ± 0.12</b>	<b>0.64 ± 0.10</b>
<b>Ce+La+Th</b>	0.050	0.024	0.006	0.95 ± 0.015	1.04 ± 0.002
	0.250	0.120	0.030	0.98 ± 0.013	1.09 ± 0.008
	0.500	0.240	0.060	1.02 ± 0.009	1.00 ± 0.046

<sup>a</sup> **Boldface values indicate a synergistic interaction ( $p < 0.01$ ).**

<sup>b</sup> **Ce-cerium; La-lanthanum; Th-thorium.**



**Fig. 2. Mode of cell death after treatment with the La+Th mixture for 24 hours. Dark gray bars represent necrosis, and light gray bars represent apoptosis.**

**Table 2. Loewe's Chemical Interaction Index (IL)**

Elements concentrations (mM)						
hours	LD	Individual elements		La + Th mixture		IL <sup>a</sup>
		Th	La	Th <sub>mix</sub>	La <sub>mix</sub>	
24	10	0,92	3,00	0.1	0.39	<b>0,24</b>
	20	0,95	4,30	0.29	1.17	<b>0,57</b>
	30	0,97	4,50	0.59	2.34	<b>0,75</b>
48	10	0,77	2,70	0,10	0,39	<b>0,27</b>
	20	0,98	3,00	0,23	1,17	<b>0,62</b>
	30	0,98	3,30	0,49	1,95	<b>1,09</b>

<sup>a</sup> IL = 1 indicates no interaction; IL < 1 indicates synergism; and IL > 1 indicates antagonism.

The interaction index was defined by the following isobolar relationship:

$$[A]_{\text{mix}} / [A] + [B]_{\text{mix}} / [B]$$

## DISCUSSION

The objective of this study was to investigate the biological responses of human lymphocytes exposed to thorium and cerium and to examine the hypothesis that the chemical interactions among thorium, cerium and lanthanum are not additive.

The results obtained demonstrate that thorium and cerium alone show no toxic effects under the applied experimental conditions, in accordance with results reported by Hirano<sup>29</sup>. The absorbed dose resulting from the radioactive decay of thorium was also not sufficient to induce an effect on cell viability.

The concomitant exposure of lymphocytes to thorium, cerium and lanthanum did not affect cell viability probably because it involved much lower concentrations of lanthanum and thorium than the cytotoxic levels in the two-metal mixture. Higher concentrations of these two elements were limited by pH constraints. However, the results of treatment with the mixture of lanthanum and thorium suggest that there is a synergistic chemical interaction between these two elements that results in a significant decrease in cell viability. Interestingly, the value of the Loewe's index was lower under the lower concentrations of the Th+La mixture, similar to results obtained in the study with low concentrations of two brominated flame retardants in human neuroblastoma cells<sup>30</sup>. This result suggests that there is an indirect relationship between the concentration of the metals in the mixture and their synergism. The relationship between metal concentrations and the intensity of synergism is observed at both exposure times: 24 and 48 hours.

Reactive oxygen species (ROS) are most likely produced when cells are treated with lanthanum<sup>29,31</sup> and sometimes also with thorium, as observed in mice<sup>29</sup>. In the literature, it has been shown that different cerium chemical species have the potential to reduce ROS production<sup>26,29,32,33</sup>. This decreased ROS production may reduce or eliminate the effects of thorium and lanthanum in the Ce+La+Th mixture.

The decrease in cell viability, observed due to synergism between thorium and lanthanum, most likely does not involve changes in DNA, as there was a predominance of necrotic cell death, and the comet assay showed no significant differences between treatments. Therefore, the synergism may result from changes in the chemical compounds or in cell receptors<sup>7</sup>.

As shown by the Loewe index<sup>28</sup>, the synergism was more intense at low doses of the La+Th mixture. This effect is an important factor when evaluating occupational risk because low doses are more representative of the metal exposures that workers are subjected to in the workplace.

The synergistic effect may have been the result of a chemical interaction between the two elements, but the low radioactivity of thorium must also be considered as potentially interfering in the process as a whole<sup>34</sup>. The absorbed dose for 1 mM of thorium, the maximum concentration used in our work, is considered low, but we cannot undervalue its potential effects. Although thorium and lanthanum alone are considered to be elements with a low toxicity for humans, it is important to perform further studies on the interactions between these chemicals and radiation. It will be necessary to perform these studies examining all of the components that are present during the mining or processing of monazite and its byproducts, which may affect the mining professionals involved. It is also important to test different metal concentration ratios, as they are related to the safety of the working conditions. Thorium is associated with other actinide and lanthanide elements in nature and with organic and inorganic chemicals as well as acids and bases during processing. Therefore, the health effects of occupational exposure to thorium in humans should not be attributed exclusively to its radioactivity; other causes must also be considered.

The relevance of addressing chemical interactions was highlighted by the Environmental Protection Agency<sup>9</sup>, when they recommended evaluating the risks associated with chemical mixtures. The toxicological consequences of chemical interactions long been recognized as important public health problems. The high propensity for simultaneous exposure to multiple chemicals requires further studies to provide greater insight into the biological effects caused by chemical mixtures<sup>35</sup>.

The cell type used in toxicity assays is relevant because of varying cells sensitivities. Lymphocytes, macrophages and osteoblasts are among the cellular models frequently chosen for such analyses. Macrophages treated with cerium and lanthanum usually present a higher toxicity response than the other two models<sup>36,37</sup>. Therefore, it is important to understand the biological responses of different cell types to these elements and chemical mixtures to evaluate the effects on human health. As noted by Simmons in

1995, “the toxicology and risk assessment of chemical mixtures are among the most perplexing and difficult areas of toxicology and risk assessment”<sup>38</sup>.

External exposure to thorium or its incorporation will always present a risk to humans because of the radioactive characteristics of this element and because it decays mostly via the emission of high-energy alpha particles. For risk analysis and public health policies, it is important to understand whether the radioactive potential of thorium is the only relevant aspect to be considered, or if chemical associations may also have effects on human health.

## References

1. Groten JP, Feron VJ, Sühnel J. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol Sci.* Jun 2001;22(6):316-322.
2. Borgert C, Price B, Wells C, Simon G. Evaluating chemical interaction studies for mixture risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment.* Apr 2001:259-305.
3. Kendysh IN. Distribution and biological effects of radioactive isotopes. 1 ed: Springfield, Department of Commerce; 1966:25-34.
4. Boecker B, Thomas R, Scott J. Thorium distribution and excretion studies II. *Health Physics.* 1963;9(2):165-176.
5. Thomas R, Lie R, Scott J. Thorium distribution and excretion studies I. Patterns Following Parenteral Administration. *Health Physics.* fevereiro 1963;9(2):153-163.
6. International Atomic Energy Agency I. Thorium fuel cycle - Potential benefits and challenges. In: International Atomic Energy Agency I, ed. *TECDOC 1450.* Viena, Austria: IAEA; 2005.
7. Flora S, Mittal M, Pachauri V, Dwivedi N. A possible mechanism for combined arsenic and fluoride induced cellular and DNA damage in mice. *Metallomics.* 2012;4(1):78-90.
8. Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology.* 1939;26(3).
9. Environmental Protection Agency E, Choudhury H, Hertzberg R, et al. *Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures.* Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency; Aug 2000. EPA/630/R-00/002.

10. Feyerabend F, Siemers C, Willumeit R, Rösler J. Cytocompatibility of a free machining titanium alloy containing lanthanum. *J Biomed Mater Res A*. Sep 2009;90(3):931-939.
11. Goldoni M, Tagliaferri S. Dose-response or dose-effect curves in in vitro experiments and their use to study combined effects of neurotoxicants. *Methods Mol Biol*. 2011;758:415-434.
12. Barbouti A, Doulias P, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic Biol Med*. Sep 2002;33(5):691-702.
13. Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3rd. ed. New York. USA1994.
14. Duke R, Witter R, Nash P, Young J, Ojcius D. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *FASEB J*. Feb 1994;8(2):237-246.
15. Gorman A, Samali A, McGowan A, Cotter T. Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry*. Oct 1997;29(2):97-105.
16. Wolnicka-Głubisz A, Rijnkels J, Sarna T, Beijersbergen van Henegouwen G. Apoptosis in leukocytes induced by UVA in the presence of 8-methoxypsoralen, chlorpromazine or 4,6,4'-trimethylangelicin. *J Photochem Photobiol B*. Nov 2002;68(2-3):65-72.
17. Collins A. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. Mar 2004;26(3):249-261.
18. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. Mar 1988;175(1):184-191.



19. Tice R, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-221.
20. Collins A, Fleming I, Gedik C. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract. *Biochim Biophys Acta*. Nov 1994;1219(3):724-727.
21. Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y, Sasaki Y. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res*. Jul 1998;415(3):229-235.
22. Panayiotidis M, Collins A. Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. *Free Radic Res*. Nov 1997;27(5):533-537.
23. Speit G, Henderson L. Review of the in vivo genotoxicity tests performed with styrene. *Mutat Res*. Jan 2005;589(1):67-79.
24. Gessner P. Isobolographic analysis of interactions: An update on applications and utility. *Toxicology*. Dec 28 1995;105(2-3):161-179.
25. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*. Jul 2002;98(1-2):163-168.
26. Celardo I, Pedersen J, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2011;3(4):1411-1420.
27. Adamiec G, Aitken M. Dose-rate conversion factor: update. *Ancient TL*. 1998;16(2):37-51.
28. Loewe S. Antagonisms and antagonists. *Pharmacological Reviews*. 1957;9(2):237-242.
29. Hirano S, Suzuki KT. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect*. 1996;104(Suppl 1).
30. Tagliaferri S, Caglieri A, Goldoni M, et al. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative

- stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Tóxicology in Vitro*. 2010;24(1):116-122.
31. Paiva A, Oliveira M, Yunes S, Oliveira L, Cabral-Neto J, Almeida C. Effects of Lanthanum on Human Lymphocytes Viability and DNA Strand Break. *Bulletin of Environmental Contamination and Tóxicology*. 2009;82:423-427.
  32. Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*. Dec 2009;5(24):2848-2856.
  33. Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen J, Traversa E, Ghibelli L. Ce(3+) Ions Determine Redox-Dependent Anti-apoptotic Effect of Cerium Oxide Nanoparticles. *Acs Nano*. Jun 2011;5(6):4537-4549.
  34. Kumar A, Mishra P, Ghosh S, et al. Thorium-induced oxidative stress mediated toxicity in mice and its abrogation by Diethylenetriamine pentaacetate. *International Journal of Radiation Biology*. 2008;84(4):337-349.
  35. Rider C, LeBlanc G. An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures. *Tóxicological Sciences*. Oct 2005:520-528.
  36. Palmer R, Butenhoff J, Stevens J. Cytotoxicity of the rare-earth-metals cerium, lanthanum, and neodymium invitro - comparisons with cadmium in a pulmonary macrophage primary culture system. *Environmental Research*. Jun 1987:142-156.
  37. Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, et al. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(5):1834-1842.
  38. Simmons JE, Evans MV, Boyes WK. Moving from external exposure concentration to internal dose: duration extrapolation based on physiologically based pharmacokinetic derived estimates of internal dose. *J Tóxicol Environ Health A*. Jun 11-25 2005;68(11-12):927-950.